

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ,
НАУКИ И КАДРОВОЙ ПОЛИТИКИ

Учреждение образования
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
ОРДЕНОВ ОКТЯБРЬСКОЙ РЕВОЛЮЦИИ
И ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»

Н. В. Барулин, А. О. Жарикова, К. Л. Шумский

МЕТОДЫ РЫБОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

*Рекомендовано учебно-методическим объединением
по образованию в области сельского хозяйства в качестве
учебно-методического пособия для студентов учреждений,
обеспечивающих получение высшего образования I ступени
по специальности 1-74 03 03 Промышленное рыбоводство*

Горки
БГСХА
2022

УДК 639(075.8)

ББК 47.2я73

Б24

*Рекомендовано методической комиссией факультета
биотехнологии и аквакультуры 30.03.2021 (протокол № 7)
и Научно-методическим советом БГСХА 31.03.2021 (протокол № 7)*

Авторы:

кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *Н. В. Барулин*;
магистр сельскохозяйственных наук *А. О. Жарикова*;
кандидат сельскохозяйственных наук, *К. Л. Шумский*

Рецензенты:

кандидат биологических наук, доцент *В. Г. Костоусов*;
доктор сельскохозяйственных наук, доцент *Е. В. Таразевич*

Барулин, Н. В.

Б24 Методы рыбохозяйственных исследований : учебно-методическое пособие / Н. В. Барулин, А. О. Жарикова, К. Л. Шумский. – Горки : БГСХА, 2022. – 204 с.
ISBN 978-985-882-257-6.

Приведены основные методы рыбохозяйственных исследований.
Для студентов учреждений, обеспечивающих получение высшего образования I степени по специальности 1-74 03 03 Промышленное рыбоводство.

УДК 639(075.8)

ББК 47.2я73

ISBN 978-985-882-257-6

© УО «Белорусская государственная
сельскохозяйственная академия», 2022

1. ОСНОВЫ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1.1. Понятие о научном исследовании

Формой осуществления и развития науки является научное исследование, представляющее собой изучение с помощью научных методов явлений и процессов, анализ влияния на них различных факторов, а также изучение взаимодействия между явлениями с целью получить убедительно доказанные и полезные для науки и практики решения с максимальным эффектом.

Целью научного исследования – определение конкретного объекта и всестороннее, достоверное изучение его структуры, характеристик, связей на основе разработанных в науке принципов и методов познания, а также получение полезных для деятельности человека результатов, внедрение их в производство с дальнейшим эффектом.

Важную роль в научном исследовании играют возникающие при решении научных проблем познавательные задачи, наибольший интерес из которых представляют эмпирические и теоретические.

По целевому назначению научные исследования бывают теоретические и прикладные.

Теоретические исследования направлены на создание новых принципов. Это обычно фундаментальные исследования. Цель их – расширить знания общества и помочь более глубоко понять законы природы. Такие разработки используют в основном для дальнейшего развития новых теоретических исследований, которые могут быть долгосрочными, бюджетными и др.

Прикладные исследования направлены на создание новых методов, на основе которых разрабатывают новое оборудование, новые машины и материалы, способы производства и организации работ и др. Они должны удовлетворять потребность общества в развитии конкретной отрасли производства.

Прикладные разработки могут быть долгосрочными и краткосрочными, бюджетными или хоздоговорными.

Научные исследования классифицируют по различным признакам:

а) по видам связи с общественным производством – научные исследования, направленные на создание новых процессов, машин, конструкций и т. д., полностью используемых для повышения эффективности производства; научные исследования, направленные на улучшение производственных отношений, повышение уровня организации производства без создания новых средств труда; теоретические работы

в области общественных, гуманитарных и других наук, которые используются для совершенствования общественных отношений, повышения уровня духовной жизни людей и др.;

б) по степени важности для народного хозяйства – работы, выполняемые по заданию министерств и ведомств; исследования, выполняемые по плану (инициативе) научно-исследовательских организаций;

в) в зависимости от источников финансирования – госбюджетные, финансируемые из средств государственного бюджета; хоздоговорные, финансируемые в соответствии с заключаемыми договорами между организациями-заказчиками, которые используют научные исследования в данной отрасли, и организациями, которые выполняют исследования;

г) по длительности разработки – долгосрочные, разрабатываемые в течение нескольких лет; краткосрочные, выполняемые обычно за один год.

1.2. Этапы научных исследований

Исследовательскую работу выполняют в определенной последовательности. Процесс выполнения включает в себя шесть этапов:

- 1) формулирование темы;
- 2) формулирование цели и задач исследования;
- 3) теоретические исследования;
- 4) экспериментальные исследования;
- 5) анализ и оформление научных исследований;
- 6) внедрение и эффективность научных исследований.

1.2.1. Формулирование темы

В научно-исследовательских разработках различают: научные направления, проблемы и темы.

Под научным направлением понимают сферу научных исследований научного коллектива, посвященных решению каких-либо крупных, фундаментальных теоретических и экспериментальных задач в определенной отрасли науки. Структурными единицами направления являются комплексные проблемы, темы и вопросы.

Под проблемой понимают сложную научную задачу, которая охватывает значительную область исследования и имеет перспективное значение. Полезность таких задач и их экономический эффект иногда можно определить только ориентировочно. Решение проблем ставит

общую задачу – сделать открытие; решить комплекс задач, обеспечивающих, например, высокую техническую готовность автомобильной техники, и т. д. Проблема состоит из ряда тем.

Тема – это научная задача, охватывающая определенную область научного исследования. Она базируется на многочисленных исследовательских вопросах. Под научными вопросами понимают более мелкие научные задачи, относящиеся к конкретной области научного исследования. Результаты решения этих задач имеют не только теоретическое, но главным образом и практическое значение, поскольку можно сравнительно точно установить ожидаемый экономический эффект.

Выбору тем предшествует тщательное ознакомление с отечественными и зарубежными источниками по данной и смежным специальностям. Постановка (выбор) проблем или тем является трудной, ответственной задачей, она включает в себя ряд этапов.

Первый этап – формулирование проблем. На основе анализа противоречий исследуемого направления формулируют основной вопрос (проблему) и определяют в общих чертах ожидаемый результат.

Второй этап включает в себя разработку структуры проблемы. Выделяют темы, подтемы, вопросы. Композиция этих компонентов должна составлять древо проблемы (или комплексной проблемы). По каждой теме выявляют ориентировочную область исследования.

На третьем этапе устанавливают актуальность проблемы, т. е. ценность ее на данном этапе для науки и техники. Для этого по каждой теме выставляют несколько возражений и на основе анализа, методом исследовательского приближения исключают возражения в пользу реальности данной темы. После такой «чистки» окончательно составляют структуру проблемы и обозначают условным кодом темы, подтемы, вопросы.

При выборе важно уметь отличать псевдопроблемы от научных проблем.

Псевдопроблемы (ложные, мнимые), какую бы внешнюю форму они не имели, в основе своей имеют антинаучный характер.

При обосновании проблем их коллективно обсуждают на заседаниях ученых советов, кафедр в виде публичной защиты, на которой выступают оппоненты, и принимают окончательное решение.

Тема должна решать новую научную задачу. Это значит, что тема в рассматриваемой постановке никогда не разрабатывалась и в настоящее время не разрабатывается, т. е. дублирование исключается. Дублирование возможно только в том случае, когда по заданию руководящих организаций одинаковые темы разрабатывают два конкуриру-

ющих коллектива в целях разрешения важнейших государственных проблем в кратчайшие сроки. Таким образом, оправданное дублирование тем (разработок) иногда может быть одним из требований.

Грань между научными и инженерными исследованиями с каждым годом все более стирается. Однако при выборе тем новизна должна быть не инженерной, а научной, т. е. принципиально новой. Если разрабатывается пусть даже новая задача, но на основе уже открытого закона, то это область инженерно-экономических, а не научных разработок. Поэтому необходимо отличать научную задачу от инженерно-экономической. Все то, что уже известно, не может быть предметом научного исследования.

Тема должна быть экономически эффективной и иметь значимость. Любая тема прикладных исследований должна давать экономический эффект в народном хозяйстве. Это одно из важнейших требований.

Тема должна соответствовать профилю научного коллектива. Каждый научный коллектив по сложившимся традициям имеет свой профиль, квалификацию, компетентность. Такая специализация, способствующая накоплению опыта исследований, дает свои положительные результаты: повышается теоретический уровень разработок, качество и экономическая эффективность, сокращается срок выполнения исследований. Однако нельзя впадать в крайность, применяя этот принцип. Если допускать монополию в науке, то исключается соревнование идей. Это может снизить эффективность научных исследований.

Важной характеристикой темы является ее осуществимость или внедряемость. При разработке темы следует оценить возможность окончания ее в плановый срок и внедрения в производственных условиях заказчика.

Обосновывая тему, научный работник должен хорошо знать производство и его запросы на данном этапе. Для этого необходимо организовывать командировки в крупные производственные объединения, управления, на предприятия, занимающиеся внедрением.

Большое значение имеет посещение отраслевых и академических институтов, кафедр родственных вузов. Особую роль приобретают беседы с ведущими научными работниками, крупными специалистами-производственниками.

Существенно упрощается методика выбора тем в научном коллективе, имеющем научные традиции (свой профиль) и разрабатывающем комплексную проблему. В таких коллективах научные исследования выполняют не одиночки, а группы, специализирующиеся на разработке тем или вопросов. Здесь начинающий работник, как правило, полу-

чает тему, которая была обоснована ранее. Вероятность получить не актуальную, не новую, не эффективную тему исключена. При коллективной разработке научных исследований большую роль приобретают критика, дискуссия, обсуждение проблем и тем. В процессе дискуссии выявляются новые, еще не решенные актуальные задачи разной степени важности, объема, сроков разработки.

1.2.2. Формулирование цели и задач исследования

Каждое научное исследование после выбора темы начинают с тщательного изучения научно-технической информации.

Цель поиска, проработки, анализа информации – всестороннее освещение состояния вопроса по теме, уточнение ее (если это необходимо), обоснование цели и задач научного исследования.

Носителями научно-технической информации могут быть различные документы:

- книги (учебники, учебные пособия, монографии);
- периодические издания (журналы, бюллетени, труды институтов, научные сборники);
- нормативные документы (стандарты, СНИП, ТУ, инструкции, временные указания, нормативные таблицы и др.);
- каталоги и прейскуранты;
- патентная документация (патенты, изобретения);
- отчеты о научно-исследовательских и опытно-конструкторских работах;
- информационные издания (сборники НТИ, аналитические обзоры, информационные листки, экспресс-информация, выставочные проспекты и др.);
- переводы иностранной научно-технической литературы;
- материалы научно-технических и производственных совещаний;
- диссертации, авторефераты;
- производственно-техническая документация организаций (отчеты, акты приемки работ и др.);
- вторичные документы (реферативные обзоры, библиографические каталоги, реферативные журналы и др.).

Для всестороннего анализа информационного материала необходимо ознакомиться с тематикой научных исследований, которые проводятся в профильных вузах и на факультетах и в отраслевых НИИ. Прорабатывая архивный материал этих организаций, нужно делать

записи лишь необходимого по теме материала с указанием номера отчета, года, темы, исполнителей.

На стадии сбора и анализа информации полезны командировки в проектные учреждения и на производственные предприятия, особенно на крупные передовые предприятия. Такие командировки позволяют выяснить, в какой степени исследуемая тема решается на производстве, на какие стороны темы следует обратить особое внимание, какие вопросы представляют первоочередной практический интерес. Желательно иметь мнение производственных коллективов по теме научного исследования.

После сбора литературных, архивных, производственных и других информационных данных и их обобщения полезно узнать мнение крупных ученых. Они могут оказать существенную помощь в разработке темы и определении объема собираемой информации.

Таким образом, научный работник, прорабатывая тему, накапливает большое количество различной информации. В зависимости от наименования и научной значимости темы объем информации может достигать 100–200 наименований и более.

1.2.3. Теоретические исследования

Теоретические исследования должны быть творческими. Творчество – это создание по замыслу новых ценностей, новые открытия, изобретения, установление неизвестных науке фактов, создание новой, ценной для человечества информации.

Опровергнуть существующие или создать новые научные гипотезы, дать глубокое объяснение процессов или явлений, которые раньше были непонятными или слабоизученными, связать воедино различные явления, т. е. найти стержень изучаемого процесса, научно обобщить большое количество опытных данных – все это невозможно без теоретического творческого мышления.

В теоретических исследованиях возможны два метода: логический и исторический.

Логический метод включает в себя гипотетический и аксиоматический.

Гипотетический метод основан на разработке гипотезы, научного предположения, содержащего элементы новизны и оригинальности. Гипотеза должна полнее и лучше объяснять явления и процессы, подтверждаться экспериментально и соответствовать общим законам диа-

лектики и естествознания. Этот метод исследования является основным и наиболее распространенным в прикладных науках.

Аксиоматический метод основан на очевидных положениях (аксиомах), принимаемых без доказательства. По этому методу теория разрабатывается на основе дедуктивного принципа. Более широкое распространение данный метод получил в теоретических науках (математике, математической логике и др.).

Исторический метод позволяет исследовать возникновение, формирование и развитие процессов и событий в хронологической последовательности с целью выявления внутренних и внешних связей, закономерностей и противоречий. Данный метод исследования используется преимущественно в общественных и главным образом исторических науках. В прикладных же науках он применяется, например, при изучении развития и формирования тех или иных отраслей науки и техники.

В теоретических исследованиях применяются вероятностно-статистические методы исследования (статистика и теория вероятностей, дисперсионный и коррекционный анализы, теория надежности, метод Монте-Карло и др.) для изучения случайных процессов – дискретных и непрерывных.

Также применяются методы системного анализа (исследование операций, теория управления, теория множеств и др.), которые получили широкое распространение в последнее время, что в значительной степени обусловлено развитием ЭВМ, обеспечивающим быстрое решение и анализ сложных математических задач.

Этап теоретических разработок научного исследования включает в себя следующие основные разделы:

- 1) изучение физической или экономической сущности процесса, явлений;
- 2) формулирование гипотезы исследования, выбор, обоснование и разработка физической или экономической модели;
- 3) математизация модели;
- 4) анализ теоретических решений, формулирование выводов.

1.2.4. Экспериментальные исследования

Наиболее важной составной частью научных исследований являются эксперименты. Это один из основных способов получить новые научные знания. Более $\frac{2}{3}$ всех трудовых ресурсов науки затрачивается на эксперименты. В основе экспериментального исследования лежит эксперимент, представляющий собой научно поставленный опыт или

наблюдение явления в точно учитываемых условиях, позволяющих следить за его ходом, управлять им, воссоздавать его каждый раз при повторении этих условий. От обычного, обыденного, пассивного наблюдения эксперимент отличается активным воздействием исследователя на изучаемое явление.

Основной целью эксперимента является проверка теоретических положений (подтверждение рабочей гипотезы), а также более широкое и глубокое изучение темы научного исследования.

Эксперимент должен быть проведен по возможности в кратчайший срок с минимальными затратами при самом высоком качестве полученных результатов.

Различают эксперименты естественные и искусственные.

Естественные эксперименты характерны при изучении социальных явлений (социальный эксперимент) в обстановке, например, производства, быта и т. п.

Искусственные эксперименты широко применяются во многих естественнонаучных исследованиях. В этом случае изучают явления, изолированные до требуемой степени, чтобы оценить их в количественном и качественном отношении.

Иногда возникает необходимость провести поисковые экспериментальные исследования. Они необходимы в том случае, если затруднительно классифицировать все факторы, влияющие на изучаемое явление, вследствие отсутствия достаточных предварительных данных. На основе предварительного эксперимента строится программа исследований в полном объеме.

Экспериментальные исследования бывают лабораторные и производственные.

Лабораторные опыты проводят с применением типовых приборов, специальных моделирующих установок, стендов, оборудования и т. д. Эти исследования позволяют наиболее полно и доброкачественно, с требуемой повторяемостью изучить влияние одних характеристик при варьировании других. Лабораторные опыты в случае достаточно полного научного обоснования эксперимента (математическое планирование) позволяют получить хорошую научную информацию с минимальными затратами. Однако такие эксперименты не всегда полностью моделируют реальный ход изучаемого процесса, поэтому возникает потребность в проведении производственного эксперимента.

Производственные экспериментальные исследования имеют целью изучить процесс в реальных условиях с учетом воздействия различных случайных факторов производственной среды.

Одной из разновидностей производственных экспериментов является сбор материалов в организациях, которые накапливают по стандартным формам те или иные данные. Ценность этих материалов заключается в том, что они систематизированы за многие годы по единой методике. Такие данные хорошо поддаются обработке методами статистики и теории вероятностей.

1.2.5. Анализ и оформление научных исследований

Основой совместного анализа теоретических и экспериментальных исследований является сопоставление выдвинутой рабочей гипотезы с опытными данными наблюдений.

В результате теоретико-экспериментального анализа могут возникнуть три случая:

1) установлено полное или достаточно хорошее совпадение рабочей гипотезы, теоретических предпосылок с результатами опыта. При этом дополнительно группируют полученный материал исследований таким образом, чтобы из него вытекали основные положения разработанной ранее рабочей гипотезы, в результате чего последняя превращается в доказанное теоретическое положение, в теорию;

2) экспериментальные данные лишь частично подтверждают положение рабочей гипотезы и в той или иной части противоречат ей. В этом случае рабочую гипотезу изменяют и перерабатывают так, чтобы она наиболее полно соответствовала результатам эксперимента. Чаще всего производят дополнительные корректировочные эксперименты с целью подтвердить изменения рабочей гипотезы, после чего она также превращается в теорию;

3) рабочая гипотеза не подтверждается экспериментом. Тогда ее критически анализируют и полностью пересматривают. Затем проводят новые экспериментальные исследования с учетом новой рабочей гипотезы. Отрицательные результаты научной работы, как правило, не являются бросовыми, они во многих случаях помогают выработать правильные представления об объектах, явлениях и процессах.

После выполненного анализа принимают окончательное решение, которое формулируют как заключение, выводы или предложения. Эта часть работы требует высокой квалификации, поскольку необходимо кратко, четко, научно выделить то новое и существенное, что является результатом исследования, дать ему исчерпывающую оценку и определить пути дальнейших исследований.

Все выводы целесообразно разделить на две группы: научные и производственные. При выполнении НИР заботятся о защите государственного приоритета на изобретения и открытия.

По результатам исследований составляют научно-технический отчет о проделанной работе с прохождением научного рецензирования.

1.2.6. Внедрение и эффективность научных исследований

Внедрение завершённых научных исследований в производство – заключительный этап НИР.

Внедрение – это передача производству научной продукции (отчеты, инструкции, временные указания, технические условия, технический проект и т. д.) в удобной для реализации форме, обеспечивающей технико-экономический эффект. Научно-исследовательская работа превращается в продукт лишь с момента потребления ее производством.

Заказчиками на выполнение НИР могут быть технические управления министерств, строительные тресты и управления, производственные предприятия, НИИ и т. д.

Подрядчик – научно-исследовательская организация, выполняющая НИР в соответствии с подрядным двусторонним договором, – обязан сформулировать предложение для внедрения.

Последнее в зависимости от условий договора должно содержать технические условия, техническое задание, проектную документацию, временную инструкцию, указание и т. д.

Процесс внедрения состоит из двух этапов: опытно-производственного внедрения и серийного внедрения (внедрение достижений науки, новой техники, новой технологии).

Как бы тщательно ни проводились НИР в научно-исследовательских организациях, все же они не могут всесторонне учесть различные, часто случайные факторы, действующие в условиях производства. Поэтому научная разработка на первом этапе внедрения требует опытной проверки в производственных условиях.

Предложения о законченных НИР рассматривают на научно-технических советах, а в случаях особо ценных предложений – на коллегиях министерства, и направляют на производство для практического применения.

2. ОРГАНИЗАЦИЯ РЫБОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В БЕЛАРУСИ И ЗА РУБЕЖОМ

2.1. Понятие об ученом

Ученый – специалист в какой-либо научной области, внесший реальный вклад в науку. Обычно учеными называют тех людей, которые применяют научный метод. Ученый может быть экспертом в одной или нескольких областях науки.

Признаки научной квалификации ученого. Основной формальный признак признания научной квалификации – публикация материалов исследований в авторитетных научных журналах и доклады на авторитетных научных конференциях (опубликованные доклады приравниваются к научным публикациям), а также издание книг в авторитетных научных издательствах.

В Беларуси сделана формальная попытка отделить авторитетные научные издания от прочих в виде списка изданий, публикации в которых признаются Высшей аттестационной комиссией (ВАК). Однако даже среди авторитетных изданий и конференций существует понимаемая не вполне однозначно система приоритетов. Как правило, наибольшим приоритетом пользуются международные издания и конференции и признание на международном уровне выше национально-го. Авторитет и признание квалификации ученого связаны с его известностью в кругах специалистов. Существуют попытки выстроить рейтинги по числу ссылок на работы данного ученого из работ других ученых.

Принадлежность к профессиональной науке и уровень квалификации ученого могут формально определяться местными и национальными квалификационными комиссиями (совет по защите диссертаций, аттестационная комиссия, ВАК). В Беларуси квалификация ученого формально подтверждается ученой степенью (кандидат или доктор наук) и ученым званием (доцент или профессор). Присуждение ученых степеней, и присвоение ученых званий контролируется Высшей аттестационной комиссией. Ученые степени присуждаются по направлениям наук, например: кандидат физическо-математических наук, кандидат юридических наук и т. п.

Для получения соответствующей ученой степени необходимо написать и защитить в специализированном совете диссертацию. В виде исключения и при больших научных заслугах диссертация может заменяться докладом о проделанной работе. Обязательным

условием успешной защиты является публикация и апробация результатов научной работы. Под апробацией обычно понимаются выступления на конференциях, так как эта форма позволяет дискуссионно обсудить результаты и соответственно получить открытую критику при несогласии научного сообщества.

Для получения ученого звания (доцента или профессора) кроме ученой степени требуется вести педагогическую работу, в частности иметь учебно-методические публикации. Существуют и более мелкие формальные признаки признания квалификации, например разрешение руководить научной работой аспирантов является необходимой ступенькой перехода от кандидата к доктору.

Высшая степень формального признания со стороны научного общества в Беларуси – избрание в Национальную академию наук Беларуси.

Одним из знаков высшей степени признания мировым научным сообществом служит Нобелевская премия.

В научном сообществе высоко ценится педагогическая работа. Право читать лекции в престижном учебном заведении также является признанием уровня и квалификации ученого. Высоко также ценится создание научной школы, т. е. подготовка нескольких ученых, развивающих идеи учителя.

Классификация ученых. Формальная классификация ученых производится в процессе присуждения ученых степеней и присвоения ученых званий. Ученые степени, как и признание полученного высшего образования, классифицируют по отраслям знаний. Можно, например, получить диплом или степень по одной или нескольким биологическим дисциплинам, но нельзя получить степень по всем наукам сразу. Ученая степень не гарантирует присвоение ученого звания, и поэтому квалификация профессора выше, чем квалификация кандидата тех же наук, но нельзя сопоставлять квалификацию профессора в одной области знаний с квалификацией кандидата наук в другой области.

2.2. Ученая степень

Ученая степень – степень квалификационной системы в науке, позволяющей ранжировать научных деятелей на отдельных этапах академической карьеры.

Ученые степени, присуждаемые в различных странах, существенно различаются по названиям, требованиям к квалификации, процедуре

присуждения и (или) утверждения. В США, Великобритании и целом ряде других европейских стран, присоединившихся к Болонскому процессу, проводится гармонизация номенклатуры ученых степеней, предполагающая установление единых требований для трех степеней в каждой отрасли знаний:

1) бакалавра;

2) магистра;

3) доктора философии (здесь под философией понимаются науки вообще, а не собственно философия; параллельно существуют аналогичные степени доктора права, медицины, теологии и т. п.), присуждаемых аккредитованным высшим учебным заведением. Параллельно со степенью доктора философии (Ph. D., произносится «пиз-эйч-ди»; не путать с доктором философских наук) и многочисленными (но более редко присуждаемыми) приравненными к ней степенями существуют аналогичные степени доктора права, теологии и т. п., присуждаемые аккредитованным высшим учебным заведением. Степени доктора права (D. L.), медицины (D. M.), делового администрирования (D. B. A) и т. д. во многих странах рассматриваются как составляющие систему профессионального, а не академического (исследовательского) доктората, т. е. предполагается, что обладатель такой степени занимается, как правило, практической деятельностью, а не наукой. Получение таких степеней также не требует выполнения самостоятельно научного исследования, поэтому профессиональный докторат обычно не считается ученой степенью. Отнесение той или иной степени к профессиональному или исследовательскому докторату зависит от страны и даже от конкретного университета. Так, в США и Канаде степень доктора медицины является профессиональной, а в Великобритании, Ирландии и многих странах Британского Содружества – исследовательской. Ряд университетов Великобритании (включая Оксфорд и Кембридж) даже включают степень доктора медицины в высший докторат (приблизительный аналог доктора наук в Беларуси и России), требующий существенного вклада в медицинскую науку.

В Беларуси применяется унаследованная от Советского Союза система германского образца, в которой существуют две степени:

1) кандидат наук;

2) доктор наук.

В настоящее время ученая степень как кандидата, так и доктора наук присуждается диссертационным советом. Однако если для получения диплома кандидата наук достаточно положительного решения

совета, то для получения диплома доктора наук необходимо также наличие положительного заключения экспертного совета соответствующего направления Высшей аттестационной комиссии. Лица, которым ученые степени присуждены с нарушением установленного порядка, могут быть лишены этих степеней Высшей аттестационной комиссией, как правило, на основании ходатайств диссертационных советов, на заседании которых состоялась защита диссертаций.

Для получения степени кандидата или доктора наук необходимо подготовить диссертацию и защитить ее на заседании диссертационного совета, созданного при вузе, НИИ или другом научном учреждении. Для защиты диссертации на соискание степени доктора в настоящее время необходимо иметь степень кандидата наук, защита диссертации на соискание степени доктора наук лицами, не имеющими степени кандидата, в соответствии с ныне действующим Положением о порядке присуждения ученых степеней и званий, предусматривается в особых случаях. Следует заметить, что при этом соответствие или родственность отраслей наук и специальностей ранее полученных (последовательно) высшего образования, степени кандидата наук и соисканной степени доктора наук фактически никак не регламентируется, кроме случаев соискания ученых степеней по медицинским, ветеринарным и юридическим наукам, которые возможны только при наличии у соискателя высшего медицинского, ветеринарного или юридического образования соответственно. Фактически на практике признаются вполне допустимыми и никак не ограничиваются ВАК случаи получения более высокой степени по отрасли наук и специальности, неродственной к уже имеющейся: например кандидата экономических наук инженерами (математиками, химиками), степени доктора экономических наук кандидатами, например, технических и физико-математических наук и т. п.

Аналогом ученой степени кандидата наук в большинстве стран является степень доктора философии (Ph. D.) и многочисленные приравненные к ней степени, приблизительным аналогом в странах с двухступенчатой системой (например, в Германии) – степень хабилированного доктора.

2.2.1. Кандидат наук

Кандидат наук – ученая степень первой ступени (до доктора наук) в Республике Беларусь, ряде стран СНГ и в СССР. Соответствует степени доктора философии (Ph. D.) в западных странах.

Порядок присуждения. В Беларуси ученая степень кандидата наук присуждается диссертационным советом, состоящим из докторов наук по данной специальности и действующим при университете или научно-исследовательском институте, по итогам публичной защиты кандидатской диссертации.

Одним из требований предзащитной подготовки является наличие опубликованных в рецензируемых журналах из списка ВАК научных статей, содержащих результаты изысканий диссертанта и отражающих научную новизну исследования.

Диссертация выполняется соискателем под руководством научного руководителя, имеющего ученую степень доктора (или кандидата) наук по данной специальности, обычно (но не обязательно) во время учебы в аспирантуре (адъюнктуре).

В 2014 г. с принятием нового Закона Украины «О высшем образовании» степень кандидата наук упразднена и приравнена к степени доктора философии (Ph. D.).

В Беларуси допускается выдача диплома доктора философии кандидатам наук, если этого требует их профессиональная деятельность (например, участие в международных проектах).

2.2.2. Доктор наук

Доктор наук – ученая степень второй, высшей ступени (после кандидата наук) в СССР, Республике Беларусь, а также в ряде стран СНГ и в некоторых бывших социалистических странах.

В белорусских вузах докторская степень является одним из условий для участия в конкурсе на замещение должности профессора, а также присвоения одноименного ученого звания.

Порядок присуждения степени. В Беларуси степень доктора наук присуждается Президиумом Высшей аттестационной комиссии по результатам публичной защиты докторской диссертации. Соискатель, как правило, должен иметь ученую степень кандидата наук. Диссертация на соискание ученой степени доктора наук должна быть научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как новое крупное научное достижение, либо решена крупная научная проблема, имеющая важное социально-культурное или хозяйственное значение, либо изложены научно обоснованные технические, экономические или технологиче-

ские решения, внедрение которых вносит значительный вклад в развитие экономики страны и повышение ее обороноспособности.

Перечень ученых степеней, присуждаемых в Республике Беларусь:

доктор архитектурных наук;
доктор биологических наук;
доктор ветеринарных наук;
доктор военных наук;
доктор географических наук;
доктор геолого-минералогических наук;
доктор искусствоведения;
доктор исторических наук;
доктор культурологии;
доктор медицинских наук;
доктор педагогических наук;
доктор политологических наук;
доктор психологических наук;
доктор сельскохозяйственных наук;
доктор социологических наук;
доктор технических наук;
доктор фармацевтических наук;
доктор физико-математических наук;
доктор филологических наук;
доктор философских наук;
доктор химических наук;
доктор экономических наук;
доктор юридических наук;
кандидат архитектурных наук;
кандидат биологических наук;
кандидат ветеринарных наук;
кандидат военных наук;
кандидат географических наук;
кандидат геолого-минералогических наук;
кандидат искусствоведения;
кандидат исторических наук;
кандидат культурологи;
кандидат медицинских наук;
кандидат педагогических наук;
кандидат политологических наук;
кандидат психологических наук;

кандидат сельскохозяйственных наук;
кандидат социологических наук;
кандидат технических наук;
кандидат физико-математических наук;
кандидат фармацевтических наук;
кандидат филологических наук;
кандидат философских наук;
кандидат химических наук;
кандидат экономических наук;
кандидат юридических наук;
без ученой степени.

2.2.3. Известные доктора наук Беларуси в области рыбохозяйственных исследований



**Агеец Владимир
Юльянович**
(род. в 1949 г.),
доктор
сельскохозяйственных наук,
профессор, директор
Института рыбного
хозяйства Национальной
академии наук Беларуси



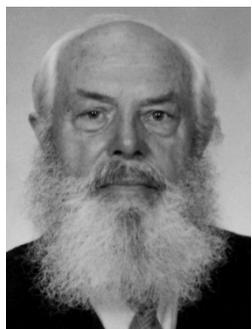
**Байчоров Владимир
Мухтарович** (род. в 1951 г.),
доктор биологических наук.
Тема докторской
диссертации:
Сравнительный анализ
репродуктивной экологии
гидробионтов



Винберг Георгий Георгиевич (1905–1987), выдающийся гидробиолог с мировым именем, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент АН СССР, заслуженный деятель науки РСФСР. Тема докторской диссертации: Биотический баланс вещества и энергии в озере



Галковская Галина Афанасьевна (род. в 1938 г.), доктор биологических наук, профессор. Тема докторской диссертации: Эколого-физиологические закономерности функционирования популяций планктонных коловраток



Жуков Прохор Иванович (1915–2003), выдающийся белорусский ихтиолог, доктор биологических наук, профессор. Тема докторской диссертации: Рыбы Белоруссии



**Жукова Татьяна
Васильевна** (род. в 1953 г.),
доктор биологических наук.
Тема докторской
диссертации: Потоки
фосфора и азота в
пограничном слое «дно –
вода» и их роль в
функционировании
полимиктических озер



**Камлюк Лилия
Васильевна** (род. в 1937 г.),
доктор биологических наук,
профессор.
Тема докторской
диссертации:
Закономерности
функционирования
зоопланктонного сообщества
экосистем рыбоводных
прудов



**Каратаев Александр
Юрьевич** (род. в 1954 г.),
доктор биологических наук,
профессор. Тема докторской
диссертации: Структура
и функционирование
сообществ донных и
перифитонных
беспозвоночных водоемов-
охлаждителей



**Козлов Александр
Иванович**

(род. в 1947 г.), доктор сельскохозяйственных наук, доцент. Тема докторской диссертации: Формирование продуктивности прудовых экосистем при различных методах интенсификации



**Козлова Тамара
Васильевна**

(род. в 1946 г.), доктор сельскохозяйственных наук, доцент. Тема докторской диссертации: Биолого-технологические основы формирования фитопланктона для интенсивного производства рыбопродукции



**Кончиц Виктор
Владимирович**

(род. в 1941 г.), доктор сельскохозяйственных наук, профессор. Тема докторской диссертации: Интенсификация рыбоводства Беларуси на основе поликультуры растительноядных рыб



Кохненко Серафим Васильевич (1914–1977), доктор биологических наук, профессор. Тема докторской диссертации: Биологические особенности европейского угря и перспективы его рыбохозяйственного использования



Кулеш Виктор Федорович (род. в 1952 г.), доктор биологических наук, доцент. Тема докторской диссертации: Биологические основы тепловодной аквакультуры промысловых ракообразных



Михеева Тамара Михайловна (род. в 1938 г.), выдающийся белорусский гидробиолог, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник. Тема докторской диссертации: Структура и функционирование фитопланктона при эвтрофировании вод



Остапеня Александр Павлович (1939–2012), выдающийся белорусский гидробиолог, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси. Тема докторской диссертации: Сестон и детрит как структурные и функциональные компоненты водных экосистем



Петухов Владимир Борисович (род. в 1951 г.), доктор биологических наук. Тема докторской диссертации: Пресноводные угри *Anguillidae*: репродуктивная биология и аквакультура



Семенченко Виталий Павлович (род. в 1951 г.), выдающийся белорусский гидробиолог, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси. Тема докторской диссертации: Закономерности функционирования ветвистоусых ракообразных при различных температурных и трофических условиях



Сушня Леонид Михайлович (1929–2015), выдающийся белорусский гидробиолог, доктор биологических наук, профессор, академик НАН Беларуси и РАН, заслуженный деятель науки БССР. Тема докторской диссертации: Количественные закономерности метаболизма и трансформации вещества и энергии ракообразными



Таразевич Елена Васильевна, доктор сельскохозяйственных наук, доцент. Тема докторской диссертации: Система селекционно-генетических методов выведения и использования белорусских пород карпа



Шалак Михаил Владимирович (1941–2021), доктор сельскохозяйственных наук, профессор. Подготовил двух белорусских докторов наук в области рыбоводства и аквакультуры. Один из инициаторов открытия специальности по рыбоводству в Белорусской государственной сельскохозяйственной академии. Сформировал и был председателем докторского совета по защите диссертаций, в том числе по специальности «Рыбное хозяйство и аквакультура»

2.3. Отрасли науки

Отрасли науки, по которым присуждаются ученые степени:

- 01.00.00 – физико-математические науки;
- 02.00.00 – химические науки;
- 03.00.00 – биологические науки;
- 05.00.00 – технические науки;
- 06.00.00 – сельскохозяйственные науки;
- 07.00.00 – исторические науки;
- 08.00.00 – экономические науки;
- 09.00.00 – философские науки;
- 10.00.00 – филологические науки;
- 12.00.00 – юридические науки;
- 13.00.00 – педагогические науки;
- 14.00.00 – медицинские науки;
- 15.00.00 – фармацевтические науки;
- 16.00.00 – ветеринарные науки;
- 17.00.00 – искусствоведение;

- 18.00.00 – архитектура;
- 19.00.00 – психологические науки;
- 20.00.00 – военные науки;
- 22.00.00 – социологические науки;
- 23.00.00 – политические науки;
- 24.00.00 – культурология;
- 25.00.00 – науки о земле.

В основном рыбохозяйственные исследования выполняются в рамках биологических и сельскохозяйственных наук, реже – в рамках ветеринарных, технических, экономических наук.

К биологическим наукам относятся следующие специальности:

- 03.00.01 – радиобиология;
- 03.00.02 – биофизика;
- 03.00.04 – биохимия;
- 03.00.05 – ботаника;
- 03.00.06 – вирусология;
- 03.00.07 – микробиология;
- 03.00.08 – зоология;
- 03.00.09 – энтомология;
- 03.00.10 – ихтиология;
- 03.00.12 – физиология и биохимия растений;
- 03.00.13 – физиология;
- 03.00.14 – антропология;
- 03.00.15 – генетика;
- 03.00.16 – экология;
- 03.00.18 – гидробиология;
- 03.00.19 – паразитология;
- 03.00.23 – биотехнология;
- 03.00.24 – микология;
- 03.00.25 – гистология и клеточная биология;
- 03.00.26 – молекулярная генетика;
- 03.00.27 – почвоведение, с.-х.;
- 03.02.14 – биологические ресурсы;
- 03.03.05 – биология развития, эмбриология.

К сельскохозяйственным наукам относятся следующие специальности:

- 06.01.01 – общее земледелие;
- 06.01.02 – мелиорация, рекультивация и охрана земель;
- 06.01.03 – агропочвоведение, агрофизика;

- 06.01.04 – агрохимия;
- 06.01.05 – селекция и семеноводство;
- 06.01.06 – овощеводство;
- 06.01.07 – защита растений;
- 06.01.09 – растениеводство;
- 06.01.10 – плодоводство;
- 06.01.11 – защита растений, биол.;
- 06.01.12 – кормопроизводство и луговоеводство;
- 06.02.01 – диагностика болезней и терапия животных, патология, онкология и морфология животных, вет.;
- 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология, вет.;
- 06.02.03 – ветеринарная фармакология с токсикологией, вет.;
- 06.02.04 – ветеринарная хирургия, вет.;
- 06.02.05 – ветеринарная санитария, экология, зоогигиена и ветеринарно-санитарная экспертиза;
- 06.02.05 – ветеринарная санитария, экология, зоогигиена и ветеринарно-санитарная экспертиза, вет.;
- 06.02.06 – ветеринарное акушерство и биотехника репродукции животных, вет.;
- 06.02.07 – разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных;
- 06.02.08 – кормление сельскохозяйственных животных;
- 06.02.09 – звероводство и охотоведение;
- 06.02.10 – частная зоотехния, технология производства продуктов животноводства;
- 06.03.01 – лесные культуры, селекция, семеноводство;
- 06.03.02 – лесоведение, лесоводство, лесоустройство и лесная таксация;
- 06.03.03 – агролесомелиорация, защитное лесоразведение и озеленение населенных пунктов, лесные пожары и борьба с ними;
- 06.04.01 – рыбное хозяйство и аквакультура.

В Беларуси, как правило, соискатели ученых степеней, проводящие рыбохозяйственные исследования, пишут диссертационные работы по специальностям: ихтиология, гидробиология, биологические ресурсы, рыбное хозяйство и аквакультура. Однако это является условным разделением, нередко диссертационные работы по рыбохозяйственным исследованиям защищаются по специальностям: биохимия; зоология; физиология; генетика; экология; разведение, селекция, генетика и вос-

производство сельскохозяйственных животных; кормление сельскохозяйственных животных и технология кормов; частная зоотехния, технология производства продуктов животноводства и по другим специальностям, в том числе в рамках ветеринарных, технических и экономических наук.

2.3.1. Ихтиология

Ихтиология – область науки, занимающаяся исследованием морфологии, систематики, физиологии, биологии и экологии рыб и разработкой научных основ по охране, воспроизводству и рациональному использованию рыбных ресурсов.

Области исследований:

1. Теоретические проблемы эволюции, систематики и географии рыб.
2. Теоретические и научно-методические проблемы биологии, анатомии и физиологии рыб.
3. Проблемы экологии, этологии и динамики популяций рыб.
4. Теоретические и прикладные проблемы воспроизводства рыбных ресурсов и рыбного хозяйства.
5. Рыбный промысел и охрана рыбных ресурсов.

2.3.2. Гидробиология

Гидробиология – наука, изучающая биологические процессы, происходящие в водных экосистемах, взаимодействие гидробионтов со средой, их роль в функционировании водных экосистем естественного и искусственного происхождения, в процессах трансформации вещества и энергии, самоочищения и эвтрофирования внутренних вод, морей и океанов, биологию и экологию гидробионтов различных таксонов и их хозяйственное использование.

Области исследований:

1. Фаунистика. Видовой состав, фенетическая и морфологическая структура таксонов.
2. Флористика. Видовой состав, структура сообществ фитопланктона, перифитона и высшей водной растительности.
3. Водная микробиология и вирусология. Микроорганизмы водных экосистем, таксономическая принадлежность, динамика численности и типология. Санитарная гидробиология.

4. Экология популяций и сообществ. Взаимосвязь гидробионтов со средой обитания, закономерности функционирования, пространственного и временного распределения водных организмов, исследование сукцессионных процессов в водных экосистемах различного типа.

5. Физиология и биоэнергетика гидробионтов. Процессы роста, развития, питания, дыхания, размножения и энергетического баланса водных животных и их связь с факторами среды.

6. Продукционные процессы в водных экосистемах. Первичная и вторичная продукция, взвешенное вещество, перифитон, деструкция органического вещества, эффективность утилизации и поток энергии в популяциях, сообществах и трофических цепях.

7. Аквакультура (водоросли, беспозвоночные и позвоночные животные). Разработка принципов и методов ведения, поиск и изучение перспективных объектов для культивирования.

8. Биоиндикация поверхностных вод.

2.3.3. Биологические ресурсы

Биологические ресурсы – область биологической науки, занимающаяся изучением объектов растительного и животного происхождения в водных и наземных экосистемах, являющихся незаменимыми звеньями трофических цепей этих экосистем, определяющих их устойчивое существование и развитие, а также используемых в различных сферах хозяйственной деятельности для прямого или косвенного потребления.

Области исследований:

1. Видовой состав, численность популяций ресурсных видов растений и животных и мест их естественного обитания.

2. Динамика (сезонная, многолетняя) состояния, развития и темпов воспроизводства и элиминации популяций ресурсных видов.

3. Расчет продуктивности, величин и сроков изъятия, обеспечивающих устойчивое существование и развитие популяций ресурсных видов.

4. Обоснование выделения территорий и видов, находящихся под угрозой существования, с целью их сохранения, обеспечения восстановления и последующего использования.

5. Разработка практических мероприятий и регламентов поддержания устойчивого развития и эксплуатации ресурсных видов на определенных территориях.

6. Интродукция и реинтродукция хозяйственно ценных видов растений и животных, разработка регламентов интродукции в пространственном и временном аспектах, культивирование.

7. Расчет экологических рисков для существования сообществ ресурсных видов животных и растений на территориях их обитания при планировании хозяйственных мероприятий.

8. Разработка биологических обоснований для формулирования и принятия законодательных актов по охране и рациональному использованию ресурсных видов.

2.3.4. Рыбное хозяйство и аквакультура

Рыбное хозяйство и аквакультура – область науки, которая изучает биологические и хозяйственные особенности гидробионтов с целью эффективного использования их для производства продуктов животноводства; разрабатывает методы воспроизводства, выращивания и содержания рыб и водных беспозвоночных, а также прогрессивные технологии производства продуктов рыбоводства и аквакультуры.

Области исследований:

1. Биологические и хозяйственные особенности гидробионтов при различных условиях их выращивания и содержания; особенности и закономерности развития и формирования продуктивных качеств объектов рыбного хозяйства и аквакультуры в условиях различных технологий.

2. Новые виды гидробионтов в сельскохозяйственном производстве; их создание и сравнительное испытание применительно к различным условиям их использования.

3. Методы комплексной оценки и ранней диагностики продуктивных качеств объектов рыбного хозяйства и аквакультуры; повышение продуктивных и воспроизводительных качеств гидробионтов; повышение качества продукции.

4. Методы и способы повышения биопродуктивности водоемов, предназначенных для выращивания гидробионтов.

5. Усовершенствование существующих и разработка новых методов, способов, технологических приемов, приборов и конструкций, позволяющих повысить эффективность получения, выращивания и эксплуатации молоди, товарной продукции и производителей гидробионтов.

6. Разработка ресурсосберегающих технологий ведения аквакультуры.

7. Испытание и рыбоводно-технологическая оценка систем и конструкций оборудования для рыбного хозяйства и аквакультуры.

2.4. Ученое звание

Ученое звание – ступень квалификационной системы в высшей школе и науке, позволяющей ранжировать научных и научно-педагогических сотрудников на отдельных этапах академической карьеры.

Ученые звания в Беларуси. В настоящее время в Беларуси присваиваются два основных ученых звания: доцент и профессор. Эти звания присваиваются по определенным специальностям. Слова «доцент» и «профессор» при этом являются общепринятыми сокращениями полного наименования званий, указывающих на сферу деятельности: «доцент (профессор) по такой-то специальности». Прочие титулы и понятия, относящиеся к занятым в научно-образовательной сфере лицам, (например, доктор наук, член-корреспондент, научный сотрудник, ассистент) учеными званиями не являются.

Ученые звания присваивает Высшая аттестационная комиссия. Звание доцента получают, как правило, кандидаты, а звание профессора – только доктора наук. Звание всегда присваивается пожизненно и сохраняется за его обладателем при смене должности, места работы, после ухода на пенсию.

Не следует смешивать ученые звания доцента и профессора с должностями в вузах, имеющими аналогичные наименования. Для вступления в эти – и даже более высокие, такие как декан или проректор, – должности наличия звания часто не требуется. Обычно ученое звание присваивается уже после определенного времени работы в соответствующей должности и при выполнении ряда других необходимых условий. Например, доктор наук, имеющий ученое звание доцента, может занять должность профессора, а затем через несколько лет быть выдвинут на звание «профессор».

Предмет работы при этом должен соответствовать профилю, по которому было получено звание.

Правила присвоения ученых званий в разных странах различны и часто основаны на национальных традициях, хотя предпринимаются шаги к унификации. В отличие от Беларуси и стран бывшего СССР, в большинстве государств отсутствует выраженное разграничение одноименных должностей и званий: например, прием сотрудника на должность профессора в учебном заведении одновременно означает получение титула профессора. Общим является строгое дифференцирование степеней от званий – ученая степень документирует квалификацию

сотрудника, а звание отражает его соответствие конкретной научно-педагогической должности.

Наименования званий во многих странах повторяют принятые в Беларуси термины «доцент» и «профессор» с различными определениями: заслуженный, полный, ординарный, ассоциированный и т. п. В ряде стран учеными званиями также считаются ассистент, лектор, постдок. При этом ассоциированный профессор (associate professor) примерно соответствует белорусскому доценту, а ассистент-профессор (assistant professor) – просто научному сотруднику без звания.

Перечень специальностей, по которым присваиваются ученые звания в Республике Беларусь.

Раздел I. Естественные науки.

1. Математика.
2. Механика.
3. Астрономия.
4. Физика.
5. Химия.
6. Физико-химическая биология.
7. Общая биология.
8. Физиология.

Раздел II. Технические науки.

9. Машиностроение и машиноведение.
10. Энергетика.
11. Электротехника.
12. Приборостроение и метрология.
13. Радиотехника и связь.
14. Информатика и вычислительная техника.
15. Металлургия.
16. Материаловедение.
17. Технология (по отраслям: химическая, продовольственных продуктов, материалов и изделий текстильной и легкой промышленности, лесного хозяйства, деревопереработки и деревообработки).
18. Агроинженерные системы.
19. Транспорт.
20. Строительство.
21. Архитектура.
22. Электроника и нанoeлектроника.
23. Экология.
24. Безопасность деятельности человека.

Раздел III. Сельскохозяйственные науки.

- 25. Агрономия.
- 26. Ветеринария.
- 27. Зоотехния.
- 28. Лесоведение.

Раздел IV. Гуманитарные науки.

- 29. Документалистика и библиотековедение.
- 30. История.
- 31. Археология.
- 32. Философия.
- 33. Литературоведение.
- 34. Языкознание.
- 35. Искусствоведение.
- 36. Искусство.
- 37. Культурология.
- 38. Туризм.
- 39. Физкультура и спорт.

Раздел V. Социально-экономические и общественные науки.

- 40. Экономика.
- 41. Право.
- 42. Педагогика.
- 43. Психология.
- 44. Социология.
- 45. Политология.

Раздел VI. Медицинские науки.

- 46. Клиническая медицина.
- 47. Профилактическая медицина.
- 48. Медицинская биология.
- 49. Фармацевтика.

Раздел VII. Науки о Земле.

- 50. География.
- 51. Геология.
- 52. Геодезия и землеустройство.

Раздел VIII. Военные науки.

- 53. Военное искусство и военное строительство.
- 54. Вооружение и военная техника.
- 55. Государственная безопасность.

2.5. Организации Беларуси, осуществляющие рыбохозяйственные исследования. Национальная академия наук Беларуси

Национальная академия наук Беларуси (НАН Беларуси) – высшая государственная научная организация Республики Беларусь, осуществляющая организацию, проведение и координацию фундаментальных и прикладных научных исследований и разработок по различным направлениям естественных, технических, гуманитарных, социальных наук и искусств.

Основными научными и научно-организационными подразделениями Национальной академии наук Беларуси являются отделения Академии наук, которые объединяют академиков и членов-корреспондентов Академии наук одной или нескольких областей науки, координируют деятельность научных и иных организаций соответствующих областей науки, закрепленных за отделениями Президиумом НАН Беларуси. Отделением руководит академик-секретарь, являющийся членом Президиума Академии наук и назначаемый на должность решением Президиума Академии наук.

Отделения НАН Беларуси:

Отделение аграрных наук;

Отделение биологических наук;

Отделение гуманитарных наук и искусств;

Отделение медицинских наук;

Отделение физики, математики и информатики;

Отделение физико-технических наук;

Отделение химии и наук о Земле.

В Отделении аграрных наук рыбохозяйственными исследованиями занимаются в республиканском дочернем унитарном предприятии «Институт рыбного хозяйства» республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству», которое включает в себя следующие *лаборатории и подразделения:*

- лаборатория селекции и племенной работы;
- лаборатория разведения и выращивания ценных видов рыб;
- лаборатория кормов;
- лаборатория болезней рыб;
- лаборатория гидробиологии и качества среды;
- лаборатория рыбоводства и рыболовства в естественных водоемах;

- отдел маркетинга и научно-технической информации;
- селекционно-племенной участок «Изобелино»;
- хозрасчетный рыбоводный участок «Вилейка».

В Отделении биологических наук рыбохозяйственными исследованиями занимаются в государственном научно-производственном объединении «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по биоресурсам» (лаборатория гидробиологии, лаборатория ихтиологии) и в государственном научном учреждении «Институт генетики и цитологии» (лаборатория моделирования генетических процессов).

Рыбохозяйственными исследованиями занимаются в ряде *высших учебных заведений Беларуси*:

Белорусская государственная сельскохозяйственная академия (кафедра ихтиологии и рыбоводства, а также другие кафедры факультета биотехнологии и аквакультуры);

Полесский государственный университет (кафедра технологий аквакультуры);

Белорусский государственный университет (биологический факультет: кафедра зоологии, кафедра общей экологии и методики преподавания биологии, научно-исследовательская лаборатория гидроэкологии).

Кроме того, рыбохозяйственные исследования проводятся в ряде других вузов Беларуси: Гродненский государственный аграрный университет, Витебская государственная академия ветеринарной медицины, Мозырский государственный педагогический университет имени И. П. Шамякина, а также другие университеты, занимающиеся подготовкой биологов.

3. ПРАВИЛА ВЕДЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ ДОКУМЕНТАЦИИ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

К первичной документации научных исследований относятся оригиналы, заверенные копии документов или специально изготовленные исполнителями документы, отражающие процесс исследовательской работы и подтверждающие факт ее проведения. Первичная документация должна в полной мере содержать непосредственные результаты научных исследований и другие данные, которые были впервые получены в ходе выполнения работ.

Объем информации, который приводится в первичной документации, должен быть таким, чтобы независимый эксперт соответствующей квалификации при необходимости был способен представить процедуру исследования.

Все данные, представленные в первичной документации, должны соответствовать цели и задачам исследования, методикам, которые были утверждены в ходе планирования научно-исследовательской работы.

Первичная документация, подтверждающая факт проведения научных исследований:

- для экспериментальных исследований: протоколы экспериментальных исследований на рыбах и других водных биологических объектах, которые должны содержать: дату, перечень рыб и их общую характеристику (шифр, вес, пол, возраст и пр.), описание места проведения и вида эксперимента, характер экспериментального воздействия, описание контрольных групп, а также отметки о проведении малоинвазивных и оперативных вмешательств, результаты лабораторных, инструментальных и других выполненных исследований, дату и способ вывода рыб из эксперимента; если того требует дизайн исследования, все животные должны быть пронумерованы, а протоколы должны содержать результаты ежедневного наблюдения за состоянием экспериментальных животных;

- для инновационных исследований: документальные подтверждения наличия разработанного инструментария, картинок изобретений, синтезированных или химически выделенных новых веществ, лекарственного растительного сырья и т. п.; протоколы синтеза сложных химических соединений из простых химических веществ или химического выделения новых веществ (с датой, местом проведения, видом синтеза, выделенным и примененным оборудованием, а также с записями о результатах экспериментального синтеза, выделения).

Первичная документация, подтверждающая вид и методики проведенных научных исследований:

- заверенные подписью непосредственного исполнителя и подписью заведующего соответствующей лабораторией университета результаты выполненных в университете клинических и лабораторных, морфологических, физиологических и других исследований биологических образцов с указанием даты, места проведения, видов анализа;
- копии результатов лабораторных и инструментальных исследований, заверенные подписью должностного лица и печатью – если исследования выполнялись в других учреждениях;
- автоматизированные (цифровые) записи, графики и кривые исследований и т. д., в том числе в распечатанном и электронном виде;
- распечатки первичных информационных массивов цифровых данных и протоколы статистических, морфометрических, сравнительных и других полученных количественных результатов исследований, заверенные подписями непосредственного исполнителя этих исследований и научного руководителя; если математическая обработка полученных результатов была выполнена в других учреждениях, распечатки и протоколы должны быть удостоверены печатью соответствующего учреждения;
- если первичными документами, в которых отображаются результаты выполненных исследований, являются другие формы документов, шаблоны, рабочие карты, распечатанные изображения УЗИ, математические вычисления на ЭВМ, формулы и пр., то они также заверяются подписями исполнителя, руководителя подразделения, лаборатории, в которых выполнялись обследования и (или) расчеты, а также удостоверяются визой руководителя и печатью соответствующего учреждения, если исследования выполнялись в других учреждениях.

Требования к оформлению первичной документации научных исследований.

1. Первичная документация заверяется подписью исполнителя научного проекта.

2. Все лабораторные, морфологические, физиологические и другие исследования выполняются на оборудовании, которое позволяет получить достоверные результаты. Измерительное оборудование обязательно подлежит ежегодной метрологической поверке, которую подтверждает клеймо на приборе или сертификат метрологического учреждения.

3. Проведение научных исследований между кафедрами и научными подразделениями университета различного профиля регламентируется Программой совместных научных исследований, подписанной заведующими соответствующих подразделений и утвержденной ректором по научной работе вуза.

4. Проведение научных исследований в сторонних организациях должно быть регламентировано соответствующим договором о научном (научно-практическом) сотрудничестве между университетом и организацией-исполнителем, заверенным подписями руководителей соответствующих организаций и печатями.

5. Проведение исследований в специализированных государственных или частных лабораториях сторонних организаций должно быть своевременно зафиксировано в журналах текущей регистрации внешних исследований и заверено подписью научного руководителя.

Место и срок хранения первичной документации научных исследований.

1. Первичная документация научного исследования (диссертационной работы) хранится на кафедре в течение 10 лет с момента приемки заключительного отчета (защиты диссертации).

2. Журналы текущей регистрации внешних исследований (которые были выполнены сторонними организациями) хранятся на кафедрах и в структурных подразделениях исполнителями научных исследований в течение 5 лет с момента приемки заключительного отчета (защиты диссертации).

3. Сертификаты ежегодной метрологической поверки измерительных приборов и оборудования хранятся у главного метролога учреждения по месту выполнения этих исследований.

Ответственность и контроль.

1. На кафедре полную ответственность за ведение и хранение первичной документации научных исследований (диссертационных работ) несет научный руководитель (соискатель) научно-исследовательской работы.

2. Заведующий кафедрой отвечает за своевременное заключение необходимых договоров, программ и соглашений, контролирует ведение журналов текущей регистрации внешних исследований, а также ежегодно представляет главному метрологу университета заявки на поверку измерительного оборудования.

3. В НИИ, ЦНИЛ и других специализированных лабораториях университета полную ответственность за ведение первичной документа-

ции научных исследований (диссертационных работ) несет директор НИИ или заведующий ЦНИЛ, специализированной лаборатории, которые отвечают за своевременное заключение необходимых договоров, программ и соглашений, контролируют ведение журналов текущих исследований, а также ежегодно представляют заявки на поверку измерительного оборудования.

4. Руководители вышеуказанных подразделений университета отвечают за оформление и хранение первичной документации научных исследований в течение срока выполнения запланированных в университете научных исследований (диссертационных работ).

5. Дважды в год научный отдел университета проводит проверки своевременности составления, полноты и правильности ведения и хранения первичной документации по всем запланированным научным исследованиям.

6. В случае возникновения спорных вопросов приказом ректора назначается комиссия по проверке первичной научной документации.

4. ОСНОВЫ НАУЧНОЙ ЭТИКИ И БИОЭТИКИ

4.1. Основные принципы этики научного сообщества

Основные этические принципы научной деятельности, которые признаются большинством ученых, следующие:

- а) самоценность истины;
- б) ориентированность на новизну научного знания;
- в) свобода научного творчества;
- г) открытость научных результатов;
- д) организованный скептицизм.

Самоценность истины или универсализм. Ориентация исследователя и научной деятельности направлена на поиск объективного знания, а не на личные, групповые, корпоративные или национальные интересы.

Новизна научного знания. Наука существует только развиваясь, развивается она непрерывным приращением и обновлением знания.

Свобода научного творчества – идеальный, но не всегда реализуемый принцип научной деятельности. Для науки нет и не должно быть запретных тем, и определение предмета исследований есть выбор самого ученого.

Всеобщность или открытость научных достижений. На результаты фундаментальных научных исследований (не путать с изобретениями) не существует права интеллектуальной собственности, ибо они принадлежат всему человечеству. Любой ученый, получивший новые результаты, должен их опубликовать, поскольку новое знание только тогда становится составным элементом научной картины мира, когда оно проверено и признано научным сообществом.

Организованный скептицизм или исходный критицизм. Открытость для сомнений по поводу любых результатов научной деятельности, как своих собственных, так и публикуемых другими учеными.

4.2. Нарушение научной этики

Ложные заявления.

1. Фабрикация данных.
2. Фальсификация данных, например:
 - путем тайного отбора данных и отказа от нежелательных результатов;
 - путем манипуляции изображениями или иллюстрациями.

Нарушение авторского права.

1. В отношении работ другого автора, охраняемых авторским правом, значительных научных открытий, гипотез, теорий или методов исследования:

- несанкционированное использование авторских текстов (плагиат);
- присвоение методов исследования и идей (кража идей);
- узурпация научного авторства или соавторства (необоснованное их присвоение);
- фальсификация содержания;
- несанкционированная публикация или предоставление третьим лицам доступа к еще не опубликованным работам, находкам, гипотезам, теориям или научным методам.

2. Притязание на соавторство с другим лицом без его согласия либо без должных оснований.

Вред, наносимый чужой научной работе. Саботаж исследовательской работы (в том числе нанесение ущерба, разрушение или подделка экспериментальных установок, оборудования, документации, аппаратуры, программного обеспечения, химикатов или других предметов, необходимых для проведения эксперимента).

Совместная ответственность за нарушение научной этики. Совместная ответственность может являться результатом:

- активного участия в нарушении научной этики, совершаемом другими лицами;
- осведомленности о фальсификации, совершаемой другими лицами;
- соавторства в фальсифицированных публикациях;
- явного пренебрежения обязанностями контроля.

4.3. Документирование исследований и хранение исходных материалов

Научные исследования, эксперименты и численные данные могут быть воспроизведены или реконструированы только в том случае, если ясны все важнейшие этапы работы. Поэтому необходимо составление полных и точных отчетов о выполненной работе, которые следует хранить на случай возникновения сомнений по поводу опубликованных результатов и для возможной передачи информации заинтересованным лицам.

Еще одна причина, в силу которой следует хранить материалы своих исследований, заключается в том, что любая информация, произве-

денная научным сотрудником, – это всеобщее достояние (принцип открытости научных результатов).

Необходимо хранить полевые дневники, лабораторные журналы с записями о структуре и результатах экспериментов, бланки лабораторных и полевых описаний и относиться к ним как к документам строгой отчетности. Необходимо также сохранять рабочие таблицы первичных данных в электронном виде. Но не забывайте делать к ним подробные и исчерпывающие комментарии, а также резервные копии файлов.

Обязательно должны сохраняться коллекции, так как в ходе любого исследования из коллекции извлекается только часть научной информации, которая в ней содержится. Поэтому любая коллекция может быть неоднократно использована в различных исследованиях. Появляются новые методы исследования, которые могут быть использованы для изучения старых коллекций.

Для хранения коллекций служат биологические музеи – зоологические музеи.

Передача коллекций на хранение в музеи обеспечивает автору сохранение его имени и благодарную память будущих исследователей.

4.4. Биоэтические правила проведения экспериментальных исследований и испытаний на рыбах

Экспериментальные исследования на рыбах являются важным, а часто и единственным методом изучения биологических реакций на воздействие экстремальных факторов.

Существует общепризнанная необходимость строго придерживаться принципов гуманного отношения к рыбам как к объектам исследования. К числу наиболее общих из этих принципов относятся:

- наличие убедительных обоснований в необходимости планируемых экспериментальных исследований и невозможности замены рыб какой-либо моделью или альтернативным объектом исследования;
- минимизация количества привлекаемых к исследованию рыб за счет стандартизации условий эксперимента, повышения информативности методических приемов, исключения факторов, увеличивающих разброс экспериментальных данных;
- принятие мер, исключающих страдания рыб;
- обеспечение надлежащего ухода за рыбами с учетом особенностей их экологии;
- право на использование рыб в экспериментах только научно-исследовательских и высших учебных учреждений;

- строгое соблюдение правил личной гигиены экспериментатором и обслуживающим персоналом при работе с экспериментальными рыбами.

Отбор и подготовка рыб к эксперименту.

Для проведения экспериментов в полевых, аквариумных и лабораторных условиях следует отбирать здоровых рыб одного пола (при возможности) и возраста с одинаковой массой тела. Отступление от этого правила возможно в случае, если использование разнополых, разновозрастных или различающихся по иным признакам рыб входит в задачи эксперимента.

Для уменьшения статистического разброса экспериментальных данных желательно использовать рыб чистых линий, свободных от патогенной микрофлоры.

Вид рыбы должен быть адекватен целям эксперимента.

Количество рыб должно быть минимальным, но достаточным для получения достоверных результатов.

В период подготовки к эксперименту и после его окончания рыбы должны содержаться в стандартных технологических условиях и получать питание в соответствии с установленными нормами.

Транспортировка экспериментальных рыб должна осуществляться с использованием специальных контейнеров и соблюдением нормальных условий существования. Если рыбы плохо переносят условия длительной транспортировки, следует определить промежуточные пункты транспортировки, в которых рыбы могли бы отдохнуть и адаптироваться к новым климатическим или другим условиям окружающей среды. После завершения транспортировки рыбам необходим период адаптации.

Порядок проведения процедур на рыбах.

Если рыба испугана или анестезия еще не подействовала, необходимо подождать, пока рыба успокоится или заснет.

Фиксировать рыбу следует только после того, как подействует наркоз.

При работе с рыбой без анестезии после извлечения ее из воды разрешается работа с ней только на непродолжительное время.

Экспериментальные вмешательства, в том числе и хирургические операции, следует выполнять с применением седативных, анальгетических и наркотических препаратов в соответствии с нормами, принятыми в ветеринарной практике.

Нельзя проводить хирургические операции и другие болезненные процедуры на обездвиженных с помощью миорелаксантов рыбах, не

получивших анестезию. После дачи рыбе анестезии необходим постоянный контроль за ее уровнем, и при первых признаках ослабления анестезии она должна быть углублена.

Рыбы могут подвергаться только одной серьезной операции, если повторное оперативное вмешательство не предусмотрено убедительно обоснованными задачами эксперимента.

Условия содержания и питания рыб во время эксперимента определяются целями последнего, но желательно без причинения животному боли и страданий.

В послеоперационный период рыба должна получать квалифицированный уход и ветеринарную помощь. Рыба, оказавшаяся после эксперимента нежизнеспособной или испытывающей физические страдания, которые не поддаются устранению, должна быть своевременно подвергнута эвтаназии.

Эвтаназия – гуманное умерщвление животного (в том числе рыбы), применяемое в экспериментальной биологии и медицине в случаях, когда животное после эксперимента остается нежизнеспособным или испытывает физические страдания, которые не поддаются устранению, а также в случаях, когда эксперимент в соответствии с его программой завершается умерщвлением животного. При умерщвлении животное не должно испытывать эмоционального стресса. Смерть должна быть быстрой, с потерей сознания, без боли и страданий, а также надежной и необратимой. Оптимальным методом умерщвления животного является передозировка наркоза (введение анестетика в летальной дозе, втрое превышающей наркотическую дозу).

5. НАУЧНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ

Все научные исследования, проведенные научными сотрудниками, преподавателями и другими квалифицированными работниками, должны быть опубликованы и представлены обществу.

Результаты научных исследований обычно публикуют в следующих изданиях:

- сборник тезисов конференций;
- сборник материалов конференций;
- препринт;
- научный (научно-практический) сборник трудов;
- научный (научно-практический) журнал;
- отчет о НИР;
- монография;
- автореферат диссертации;
- диссертация.

В свою очередь, научные статьи, которые публикуются в сборниках научных трудов и в журналах, делятся:

- 1) на оригинальные исследования;
- 2) короткие сообщения;
- 3) обзорные статьи.

Результаты значительных научных исследований, особенно выполненных в рамках кандидатской и докторской диссертации, рекомендуется публиковать в известных журналах и сборниках, входящих в перечень рекомендованных изданий ВАК Беларуси, России, Украины.

Перечень научных изданий Республики Беларусь для опубликования результатов рыбохозяйственных исследований, рекомендованных ВАК Республики Беларусь (по состоянию на 2021 г.):

1. Доклады Национальной академии наук Беларуси.
2. Агропанорама.
3. Веснік Брэсцкага ўніверсітэта. Серыя 5. Хімія. Біялогія. Навукі аб Зямлі.
4. Веснік Віцебскага дзяржаўнага ўніверсітэта.
5. Веснік Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Серыя 5. Эканоміка. Сацыялогія. Біялогія.
6. Веснік Магілёўскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя А. А. Куляшова. Серыя В. Прыродазнаўчыя навукі: матэматыка, фізіка, біялогія.

7. Вестник Мазырскага дзяржаўнага педагагічнага ўніверсітэта імя І. П. Шамякіна.

8. Вестник Палескага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук.

9. Вестник БГУ. Серия 2. Химия. Биология. География.

10. Вестник Фонда фундаментальных исследований.

11. Вестник БДПУ. Серія 3. Фізіка. Матэматыка. Інфарматыка. Біялогія. Геаграфія.

12. Вестник Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серія аграрных навук.

13. Вестник Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серія біялагічных навук.

14. Животноводство и ветеринарная медицина.

15. Известия Гомельского государственного университета имени Ф. Скорины.

16. Наука и инновации.

17. Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины».

18. Экологический вестник.

19. Экология и животный мир.

20. Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства.

21. Вопросы рыбного хозяйства Беларуси.

22. Зоотехническая наука Беларуси.

23. Сельское хозяйство – проблемы и перспективы.

Перечень ведущих изданий Российской Федерации для опубликования результатов рыбохозяйственных исследований.

1. Вопросы ихтиологии.

2. Биология внутренних вод.

3. Рыбное хозяйство.

4. Вопросы рыболовства.

5. Вестник рыбохозяйственной науки.

6. Известия КГТУ.

7. Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство.

Особый авторитет в научной среде имеют англоязычные издания, входящие в международные реферативные и наукометрические базы данных, в том числе Scopus (табл. 5.1) и Web of Science.

Таблица 5.1. Перечень рейтинговых журналов, входящих в базу данных Scopus, для опубликования результатов рыбохозяйственных исследований

№ п/п	Название журнала	Импакт-фактор
1	Nature	32
2	Science	26
3	PLoS One	5
4	Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences	0.7
5	Zoologischer Anzeiger – A Journal of Comparative Zoology	1
6	Annals of the New York Academy of Sciences	4
7	Aquaculture	1.8
8	Aquaculture International	1
9	Aquaculture Research	1.6
10	Aquatic Living Resources	1.3
11	Archives of Polish Fisheries	0.7
12	BioEssays	3
13	Biology of Reproduction	3
14	Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences	1.5
15	Current Biology	8
16	Czech Journal of Animal Science	0.5
17	Endangered Species Research	1
18	Environmental Biology of Fishes	0.7
19	Fisheries Science	0.6
20	International Aquatic Research	0.3
21	Journal of Animal Science	1.3
22	Journal of Fish Biology	1.2
23	Journal of Morphology	1.5
24	Journal of the World Aquaculture Society	0.6
25	North American Journal of Fisheries Management	1
26	PeerJ	1
27	The Science of Nature	1.7
28	Agriculture and Natural Resources	–
29	Livestock Science	1.2
30	Zoology	1.6
31	Aquaculture Reports	–
32	Journal of Applied Ichthyology	

Англоязычные издания, входящие в международные реферативные и наукометрические базы данных, в том числе Scopus и Web of Science, в свою очередь, ранжируются по многим показателям, одним из которых является импакт-фактор.

Импакт-фактор (ИФ, или IF) – численный показатель важности научного журнала, отражающий среднее количество цитирований каждой статьи, опубликованной в конкретном журнале.

5.1. Основные структурные элементы статьи и рекомендации по их написанию

Название статьи.

- Должно привлекать внимание.
- Должно содержать наименьшее количество возможных слов.
- Должно адекватно описывать содержание.
- Должно быть информативным, но кратким и понятным любому читателю.

Ключевые слова.

- Должны быть конкретными и давать очень быстрое понимание о важности работы.
- Необходимо использовать только общепринятые сокращения, например ДНК.

Абстракт (Резюме).

- Должен соответствовать содержанию работы.
- Должен включать цели и задачи, ключевые результаты.
- Не должен иметь второстепенную информацию.
- Должен содержать в среднем 150–200 слов.
- Должен содержать в одном абзаце актуальность (проблему), цели, результаты и выводы.

Введение.

- Определяет цели работы и гипотезы.
- Нежелательно приводить много истории по направлению исследований или повторять большую часть предыдущих исследований.
- Должно мотивировать читателя к прочтению. Размер данного раздела должен быть достаточным, чтобы понять, почему эта статья важна.
- В максимально доступной форме должно быть описано, какую проблему необходимо решить автору.

- Должно содержать ссылки на серьезные работы последних лет.
- Определяет, какие пути решения существуют и какие из них являются лучшими.

Материал и методика исследований.

- Указать причину выбора метода и его целесообразность.
- Подробно описать новый метод, если он используется. Обосновать актуальность метода. Указать уровень новизны и актуальности используемых методов.
- Описать все факторы в проводимом эксперименте, которые могут повлиять на результат.
- Методы должны быть максимально расписаны. Читатель должен быть в состоянии самостоятельно воспроизвести эксперимент.
- Указать все используемое оборудование.
- Если в исследованиях использовались животные, то проведенные эксперименты должны соответствовать этическим требованиям.
- Конкретно и прозрачно отразить используемые статистические методы.

Результаты.

- Цель – простой отчет о результатах исследований.
- В данном разделе представляются данные первостепенной важности.
- Дополнительные материалы помещаются в приложении или, как правило, в электронном виде на сайте журнала.
- Должна быть максимальная открытость таблиц и рисунков.
- Данные должны быть выстроены логично.
- Необходимо объяснить любые результаты, особенно неожиданные.
- Рисунки используются только для важных данных.
- В рисунках используется расширенная легенда.
- Цвет используется только при необходимости.
- Следует учитывать оттенки и то, что выбранные цвета могут быть неразличимы между собой при черно-белой печати. Необходимо иметь в виду, что ваши данные, возможно, будут печататься в черно-белом режиме.
- Цветные рисунки и графики использовать при острой необходимости.
- Не включать без крайней необходимости длинные таблицы.
- Каждая фотография должна быть представлена с маркером масштаба.

- Легенды рисунков должны быть правильными и информативными.
- Рисунки должны быть высокого качества.
- Следует избегать чрезмерного числа рисунков.
- Рисунки и их подписи, а также таблицы должны быть понятны читателю даже без прочтения основного содержания статьи.

Дискуссия.

- Данный раздел посвящен интерпретации полученных результатов.
- Это самая главная часть статьи.
- Огромное количество статей отвергается из-за плохо написанного этого раздела.
- Спросите себя, все ли выводы были обеспечены достоверными результатами.

• Раздел «Дискуссия» считается хорошо написанным, если имеет отсыл к разделу «Введение» (логическая связь с этим разделом), а также отсыл к целям и задачам.

- Дискуссия должна дополнять результаты.
- Важно сравнивать другие опубликованные работы с вашей.
- Важно не игнорировать известные работы.
- Не использовать:
 - не подтвержденные результатами заявления;
 - неспецифические выражения;
 - новые термины, которые раньше не были упомянуты;
 - спекуляции на тему, возможные интерпретации, которые основаны на вашем воображении.
- Главное придерживаться принципа: исследования должны иметь завершённый вид (или основная часть исследований).

Заключение (Выводы).

- Представляет собой более широкое обзорное заключение.
- Должно быть обоснованным и поддерживаться результатами.
- Заключение – это не дискуссия или абстракт.
- Абстракт и заключение не должны иметь одинаковое содержание. Абстракт и заключение служат разным целям. Абстракт – это, прежде всего, реклама вашей статьи, так называемый трейлер к фильму. А заключение – это описание того, как ваши данные продвинули науку дальше.

• Выводы используют, чтобы показать, как ваша работа продвигает область исследований.

- Обеспечьте четкое обоснование того, как ваша статья продвигает область исследования или как практически применить ваши исследования.

- Незначительный свод результатов неприемлем в данном разделе.

- Предложите будущие эксперименты. Расскажите об экспериментах в стадии реализации.

- Задайте сами себе вопрос после прочтения заключения: «Что я только что прочитал?». Читатель должен ясно и просто для себя понять, что он прочитал. И почему это было значимым.

- В заключении необходимо описать будущее направление исследований.

Благодарность.

- Указать фонды, гранты и другие источники финансирования.

- Поблагодарить консультантов, лаборантов и других лиц, которые помогли вам в исследованиях.

Литература.

- Необходимо использовать как можно больше новейших данных. Например, желательно, чтобы статьи из высокорейтинговых журналов, на которые вы ссылаетесь, были не старше 2–3 лет. Во-первых, это свидетельствует о том, что вы держите руку на пульсе, т. е. следите за основными исследованиями вашей тематики. Во-вторых, это свидетельствует о том, что ваши исследования на данный момент являются актуальными для мирового научного сообщества.

- Все данные проходят проверку на антиплагиат.

- Желательно иметь ссылки на работы, входящие в список Scopus и ScienceDirect и другие крупные англоязычные базы.

- При необходимости указать конфликт интересов.

- Не приводить слишком много источников литературы, особенно если они имеют только косвенное отношение к вашей работе.

- Не приветствуется только цитирование отрывка литературы, без анализа.

- Избегать умышленного необоснованного самоцитирования или необоснованного цитирования коллег института.

Каждое научное издание имеет свои правила для авторов, которые включают как общенаучные требования, так и узкие требования, свойственные только одному журналу.

5.2. Правила написания научной статьи (журнал «Вопросы ихтиологии»)

Журнал «Вопросы ихтиологии» печатает статьи по всем разделам ихтиологии и биологическим основам рыбного хозяйства, материалы которых не были опубликованы в других изданиях.

1. Объем направляемых в редакцию статей не должен превышать 1 авторский лист (примерно 24 распечатанные через два интервала страницы, около 40000 знаков с пробелами), включая таблицы, подрисовочные подписи и список литературы. Превышение указанного объема допускается в случае, если статья заказана редколлегией, или в соответствии с решением редколлегии, принятом в ответ на обращение авторов.

2. Рукописи представляются в редакцию в электронном виде. Все элементы статьи (текст, таблицы, подписи к рисункам и т. п.) должны быть набраны шрифтом Times New Roman 12 кегля через два интервала. В электронном виде статья должна быть представлена следующими файлами: текст (входят все его элементы, включая аннотацию с ключевыми словами, таблицы, список литературы и подписи к рисункам) и рисунки (каждый рисунок представляется отдельным графическим файлом с именем, соответствующим номеру рисунка). В электронном виде статья может быть прислана по электронной почте.

3. Статья должна иметь следующие обязательные элементы:

- УДК в левом верхнем углу титульного листа (набрано курсивом);
- заголовок (набран жирным шрифтом прописными буквами); желательно избегать в названии статьи оборотов «К вопросу...», «Некоторые черты...», «Некоторые особенности...» с тем, чтобы название было более информативным и давало представление о конкретных вопросах и проблемах, обсуждаемых в статье; в заголовке рекомендуется указать латинское название объекта исследования и в скобках – семейство, к которому он относится; отряд и фамилию автора первого описания давать не нужно;

- фамилии авторов (набраны жирным шрифтом строчными буквами, инициалы находятся перед фамилиями);

- наименование учреждения, откуда направляется статья (традиционное название, т. е., например, Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО) вместо Федеральное государственное унитарное предприятие «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО)»); набрано курсивом строчными буквами;

- адрес электронной почты: указывается только один контактный e-mail автора, ответственного за переписку;

- аннотация (объем аннотации не должен превышать 1500 знаков) и ключевые слова (ключевые слова должны содержать: название объекта исследования на русском и латинском языках, название исследованных характеристик или направление исследования и географическое название района исследований; их должно быть не более 10); в кратком сообщении аннотация должна содержать два-три предложения; в аннотации недопустимо использование сокращений и аббревиатур (за исключением общепринятых), а также литературных ссылок;

- изложение материала желательно вести по следующему плану: введение; цель и задачи исследования; постановка вопроса и его освещенность в литературе; материал и методика; результаты; обсуждение полученных данных; выводы или краткое заключение; список литературы; при этом необходимо учесть, что в журнале используются следующие рубрики, выделенные в красную строку: «МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА», «РЕЗУЛЬТАТЫ», «ОБСУЖДЕНИЕ», («РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ»), «СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ» (в пределах традиционных рубрик авторы могут использовать индивидуальные заголовки и подзаголовки);

- таблицы помещаются после списка литературы (просьба не представлять таблицы в виде отдельных файлов);

- подписи к рисункам;

- сведения об авторах: в конце статьи указываются имена и отчества авторов, их точные адреса (домашний и служебный) с индексом, телефоны (домашний и служебный), e-mail, подписи (возможны их отсканированные варианты);

- файл «Для переводчика», в котором указываются переводы названия статьи, фамилий авторов, названий учреждений и основных терминов;

- авторские договоры представляются для русской и английской версий соответственно, заполняются и подписываются всеми авторами в двух экземплярах и являются обязательными (редакция не имеет права публиковать статьи без авторских договоров); бланки договоров представлены на сайтах: <http://www.naukaran.ru> (для русской версии) и <http://www.maik.ru> (для английской версии); заполненные и подписанные договоры можно присылать в редакцию в отсканированном виде по электронной почте.

4. При описании таксонов и при обсуждении номенклатуры авторы должны строго следовать Международному кодексу зоологической

номенклатуры (СПб.: ЗИН РАН, 2000) и дополнениям к нему, публикуемым в «Зоологическом журнале».

5. Цифровой материал следует по возможности представлять в виде таблиц. Каждая таблица должна быть пронумерована арабской цифрой и снабжена коротким, но полно характеризующим ее заголовком. Примечаний к таблицам желательно избегать, но если они необходимы – формулировать их кратко и ясно. Материалы таблиц не должны дублировать графические материалы. Если в статье присутствует только одна таблица, то номер ей не присваивается, а в тексте дается ссылка: (таблица). В таблице необходимо использовать шрифт размером не менее 10. В каждой ячейке таблицы должно быть только одно значение (каждая строка – в отдельной строке таблицы, каждый столбец – в отдельном столбце таблицы).

6. Единицы измерения приводятся в системе СИ. Сокращения слов, имен, названий, как правило, не допускаются, за исключением общепринятых. Все аббревиатуры должны расшифровываться. Если в тексте используется сокращенное название, то оно должно даваться в скобках при первом упоминании, смешивание краткого и полного написаний недопустимо. Первое упоминание в тексте и в таблицах названия объекта исследования приводится по-русски (если русское название существует) и по-латыни; в дальнейшем, если вид имеет русское название, приводится лишь русское название, если нет – первая буква рода и видовое название по-латыни.

Приняты следующие обозначения различных длин рыб: TL (total length) – общая длина, SL (standard length) – стандартная длина, FL (fork length) – длина по Смитту.

7. При подготовке рисунков (журнал публикует только черно-белые иллюстрации) необходимо придерживаться следующих правил:

– каждому рисунку должен соответствовать свой файл, последний необходимо поименовать, указав фамилию первого автора и номер рисунка;

– если в статье только один рисунок, номер ему не присваивается, а в тексте ссылка на него оформляется следующим образом: (рисунок) или (рисунок, *a*, *b*, *v*);

– если рисунок состоит из нескольких фрагментов, желательно представить его в двух вариантах: 1) скомпонованным со всеми обозначениями и 2) в виде отдельных частей без обозначений (в этом случае каждый фрагмент должен иметь свое название: рис. 1*a*, рис. 1*b* и т. п.);

– все обозначения, нанесенные на рисунок, должны расшифровываться в подписи к рисунку и соответствовать тексту;

– рисунки принимаются в следующих форматах: фотографии – TIFF, JPEG с разрешением не менее 300 dpi; растровые – TIFF с разрешением 600 dpi, 256 оттенков серого; векторные – в формате программы, в которой они сделаны (Corel Draw, Adobe Illustrator, Free-Hand, EPS). Допускаются графики и гистограммы в форматах Excel и Word. Не принимаются фотографии в виде PDF-файлов, а также рисунки, выполненные в малораспространенных программах;

– необходимо учитывать следующее: при полиграфическом воспроизведении рисунков четкое изображение будет только у тех иллюстраций, которые были изначально представлены в редакцию с хорошим разрешением; рисунки необходимо разгружать от излишней информации, перенося в подпись к рисунку обозначения, масштаб и оставляя на нем только самое необходимое; при использовании в рисунках большого числа столбцов, секторов круга и т. п. для лучшего восприятия желательно применять различную штриховку, а не оттенки цвета заливки.

8. Список литературы должен содержать только цитированные в статье работы, расположенные в алфавитном порядке. Сначала приводится перечень работ, опубликованных на русском языке (или на кириллице), затем на английском (или другом в английской транскрипции).

Статьи одного автора размещаются в следующем порядке: сначала приводятся работы без соавторов (по годам в порядке возрастания), потом с одним соавтором (соавторов располагают по алфавиту), потом с двумя и т. д. (всего не более четырех) соавторами (в хронологическом порядке). Если у автора в одном году опубликовано несколько работ, то после года проставляются буквы а, б, в и т. д. (2012а, 2012б, 2012в...).

9. Информация в списке литературы (ссылка) должна содержать обязательные элементы, которые располагаются в следующем порядке: фамилии авторов, инициалы авторов (указывается не более четырех авторов; если их больше четырех, то указываются три и пишется «и др.» или «et al.»; фамилии и инициалы авторов набираются курсивным начертанием); полное название статьи, название периодического издания, год издания, том, номер и страницы (если цитируются тезисы докладов, то допустимо указывать одну страницу). При повторной ссылке на то же издание вместо названия журнала надо писать «Там же»

или «Ibid.» (от лат. *ibidem* – там же). Если дается ссылка на неперiodическое издание (книгу, сборник), то, кроме того, надо указать название книги или сборника, место издания (город), издательство и общее число страниц. Сведения о редакторах, числе изданий и др. не являются обязательными. Ссылку на диссертацию надо заменять на автореферат, при этом необходимо указать город, научное учреждение (указаны на грифе) и общее число страниц. Ссылки в тексте оформляются следующим образом: «По данным Берга (1932), ...», «Ряд авторов (Берг, 1932; Jordan, 1932)...», «По данным Джордена (Jordan, 1932), ...»; необходимо иметь в виду, что ссылка дается на языке оригинала, и не использовать смешанное написание, например, «По данным Джордена (1932), ...», если работа опубликована на английском языке (правильное оформление см. выше). Если в статье указана дословная цитата, то необходимо взять ее в кавычки и указать страницу оригинала. Ссылки на неопубликованные работы не допускаются. Иногда возможно ссылаться на личное сообщение кого-либо, в таком случае надо указать инициалы и фамилию источника, а также место работы (для иностранцев в скобках указать всю эту информацию по-английски). Необходимо ссылаться на оригинал работы, опубликованной в печати, а не на ее электронную публикацию. Допустимо использовать ссылку на электронную публикацию в том случае, если статья опубликована только в интернет-издании.

5.3. Графическое и цифровое представление результатов научных исследований

Результаты научных исследований в научных статьях представляются также в виде таблиц и рисунков.

Основные требования к таблицам и рисункам заключаются в логичном, открытом и понятном представлении научных данных. Кроме того, рисунки должны иметь высокое качество, быть информативными. Все используемые символы должны быть отражены в легенде рисунка в подрисуночной подписи.

Основной принцип подготовки рисунков и таблиц – это обеспечение возможности стороннему читателю легко понять смысл проведенных исследований при анализе только таблиц и рисунков, без прочтения всей статьи.

Пример оформления таблицы в научной статье.

Таблица – Влияние аскорбиновой кислоты на среднюю массу 50-суточной личинки стерляди и результаты статистического анализа на нормальность распределения (Тест Шапиро – Уилка), однородность групповых дисперсий (Тест Ливина) и статистическую достоверность различий. Объем выборки – 50

Группа	Mean \pm SE, мг	SD	CV, %	n	Тест Шапиро – Уилка	Тест Ливина	Тест Ньюмена
Контрольная	259,0 \pm 24,1	120,6	0,5	25	$P > 0,05$	$P < 0,05$	–
Опытная № 1	296,8 \pm 25,9	121,6	0,4	22			
Опытная № 2	278,2 \pm 18,9	78,2	0,3	17			

Условные обозначения: mean – среднее значение массы;

SE – стандартная ошибка среднего; SD – стандартное отклонение;

CV – коэффициент вариации, %; n – объем выборки

Примеры оформления рисунков и подрисуночных подписей в научной статье.

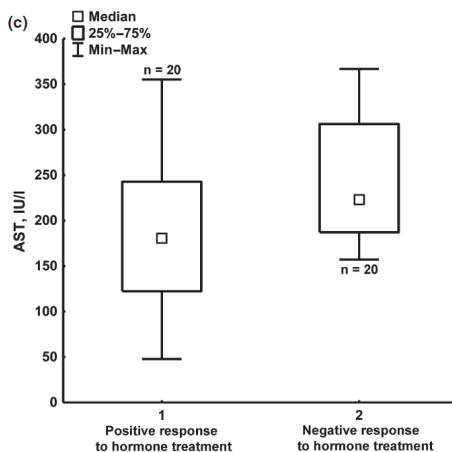


Рисунок – Активность аспаратаминотрансферазы в сыворотке крови самок сибирского осетра, положительно (1) или отрицательно (2) ответивших на гормональное стимулирование. Изображены медиана, 25–75 % перцентиль, максимальные и минимальные значения. Использовался Mann – Whitney U test ($P < 0.05$).
 Количество рыб в каждой группе – 20

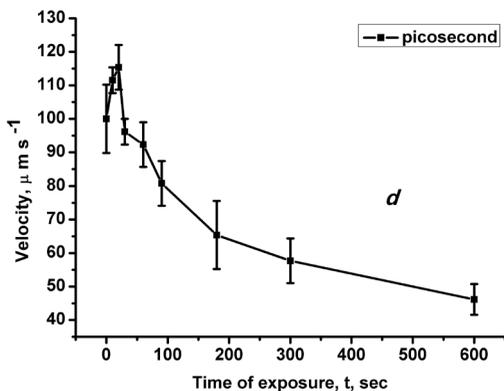


Рисунок – Эффект оптического излучения в пикосекундном частотном диапазоне ($F = 20 \text{ Hz}$, $\tau = 60 \text{ ps}$) с различным временем экспозиции ($t = 0\text{--}600 \text{ sec}$) на скорость подвижности сперматозоидов сибирского осетра. Nd: YAG-лазер. Длина волны $\lambda = 532 \text{ nm}$ (зеленый спектр). Плотность мощности $P = 3.0 \text{ mW/cm}^2$. Представлены результаты средних значений (\pm стандартная ошибка среднего). Использовался HSD test ($P < 0.05$). Объем выборки – 10

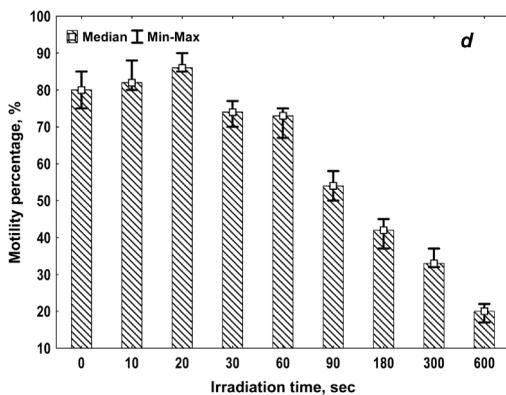


Рисунок – Эффект оптического излучения в пикосекундном частотном диапазоне ($F = 20 \text{ Hz}$, $\tau = 60 \text{ ps}$) с различным временем экспозиции ($t = 0\text{--}600 \text{ sec}$) на процент подвижности сперматозоидов сибирского осетра. Nd: YAG-лазер. Длина волны $\lambda = 532 \text{ nm}$ (зеленый спектр). Плотность мощности $P = 3.0 \text{ mW/cm}^2$. Представлены результаты медианы, а также минимальных и максимальных значений. Использовался HSD test ($P < 0.05$). Объем выборки – 10

В случае использования фотографий, отображающих различные биологические объекты, необходимо применять масштабную линейку (рис. 5.1).

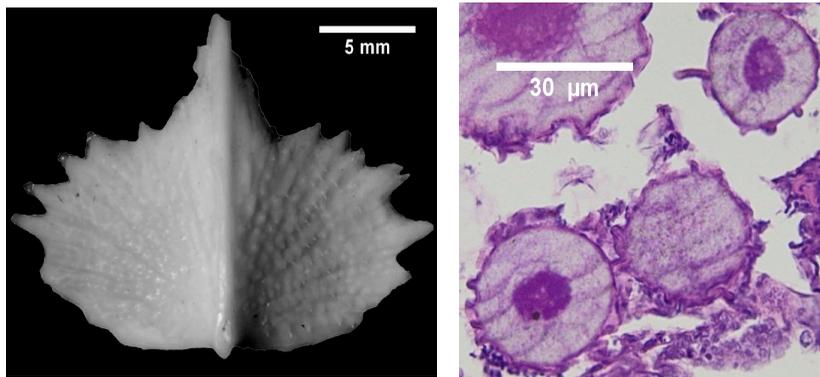


Рис. 5.1. Использование масштабной линейки

Ниже приведены различные варианты представления научных данных в виде графиков, диаграмм, корреляционных матриц и т. д. (рис. 5.2–5.17).

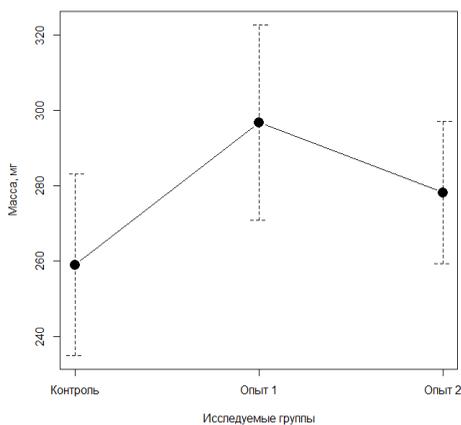


Рис. 5.2. График средних (усы показывают размах стандартной ошибки средней)

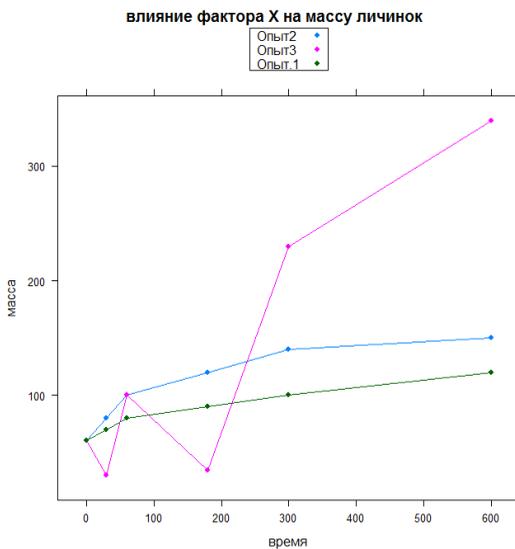


Рис. 5.3. XY – условный график

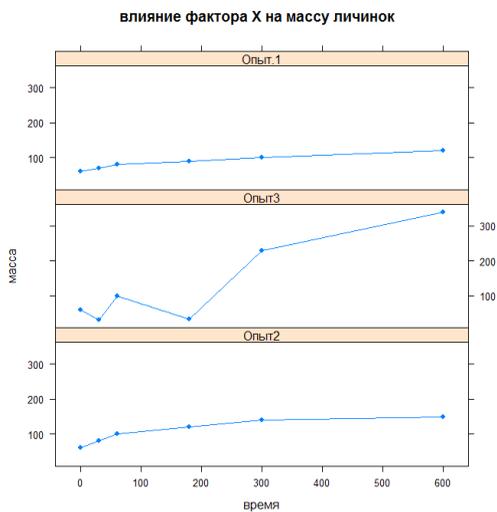


Рис. 5.4. XY – условный график, разделенный на различные панели

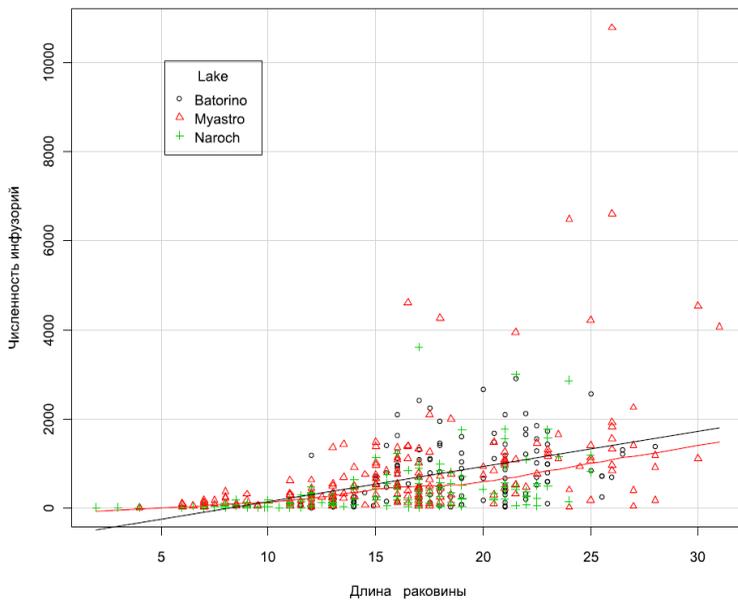


Рис. 5.5. Точечный график

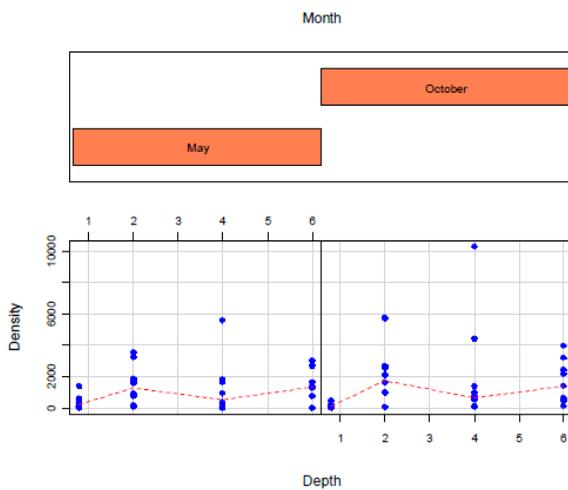
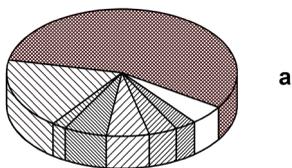


Рис. 5.6. Категоризованный график



- Нарушение кровообращения - 5 %
- Лизис части клеток сетчатки глаза - 3 %
- Повреждение частей висцерального аппарата - 4 %
- Нарушение в развитии жабр - 6 %
- Искривление тела - 6 %
- Нарушение резорбции желтка - 2 %
- Нормально развивающиеся эмбрионы - 56 %
- Нарушение в развитии обонятельных органов - 18 %

Рис. 5.7. Круговая диаграмма

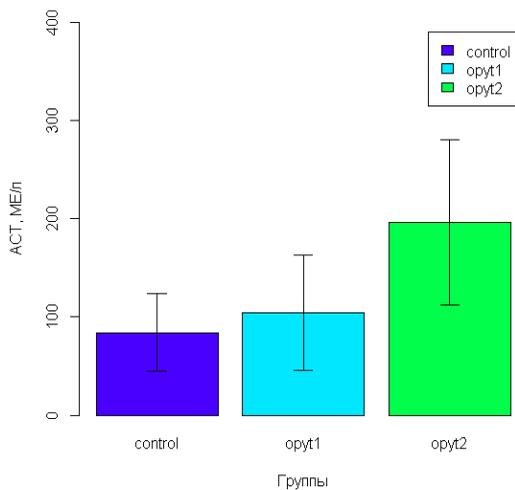


Рис. 5.8. Столбчатая диаграмма

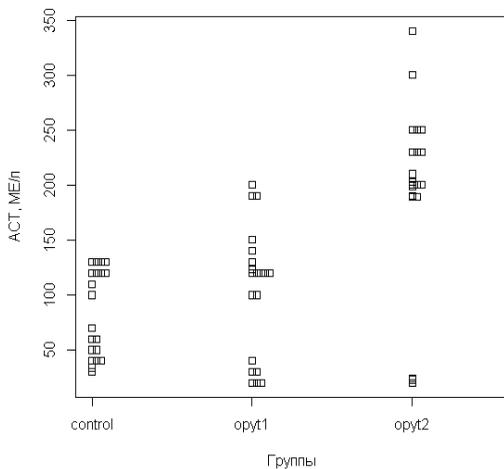


Рис. 5.9. Диаграмма рассеяния

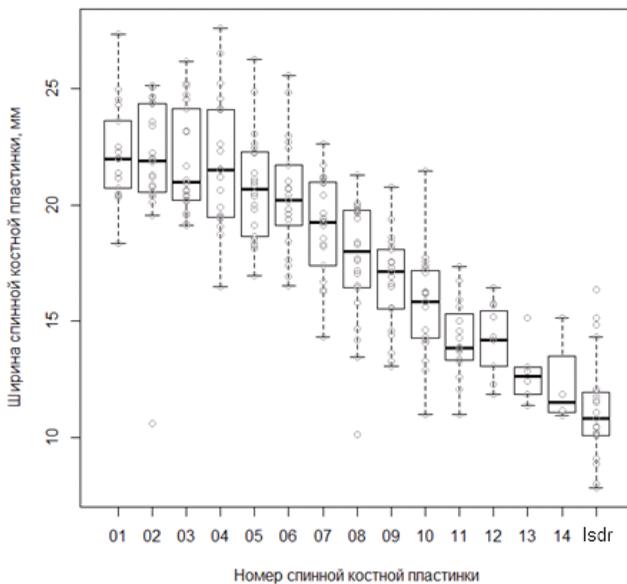


Рис. 5.10. Совмещенная диаграмма рассеяния и размахов

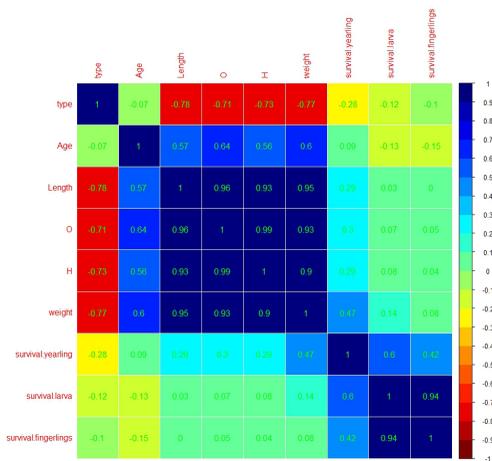


Рис. 5.11. Мультиколлинеарная корреляционная матрица (цветной вариант)

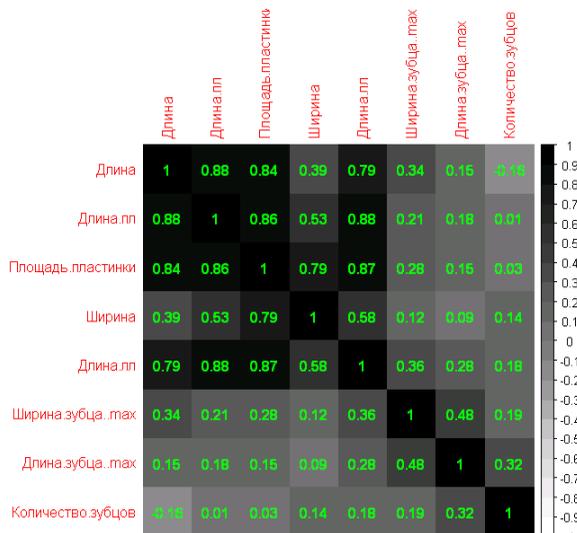
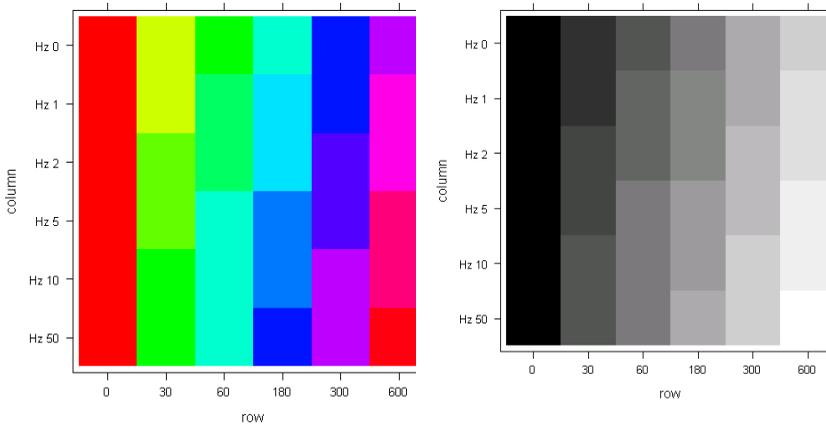


Рис. 5.12. Мультиколлинеарная корреляционная матрица (вариант для черно-белой печати)



6

2

Рис. 5.14. Различные варианты вариограмм

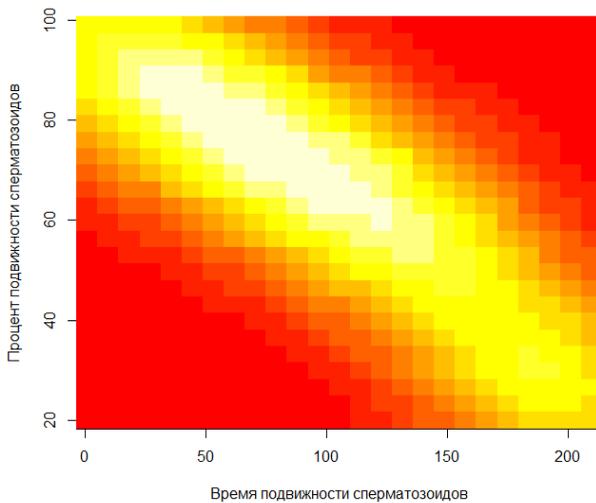


Рис. 5.15. График поверхности ядерной плотности распределения двумерной случайной величины

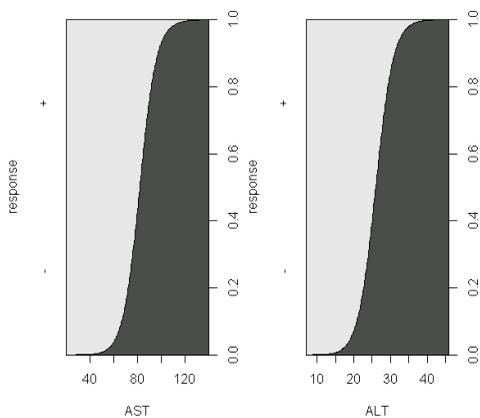


Рис. 5.16. График зависимости вероятности наблюдения

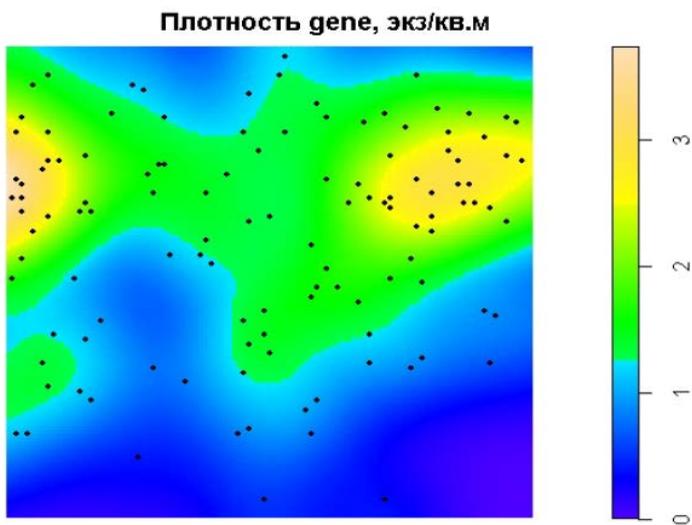


Рис. 5.17. Пространственное размещение точек

6. ОРГАНИЗАЦИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ В РЫБОВОДСТВЕ

6.1. Правила подбора рыб для эксперимента

Отбирать рыб нужно одной породы и близких по происхождению. Отбираемые рыбы должны быть типичными, без резких отклонений морфологического и физиологического характера. В группу лучше включать (особенно при постановке опыта методом пар-аналогов) однойцевых двоен, или однопометных рыб, или полубратьев, полусестер по отцу, происходящих от сходных по качеству матерей, или не родственных, но весьма сходных между собой рыб по телосложению и прочим свойствам. В аналоги можно зачислять только рыб одного пола, возраста, уровня развития, упитанности, типа телосложения, состояния здоровья (больных или переболевших включать нельзя), уровня плодовитости.

6.2. Характеристика периодов эксперимента

Исследования, схема которых основана на принципе групп, как правило, делятся на три периода: *уравнительный, или предварительный; переходный; главный, или учетный.*

Уравнительный, или предварительный, период. В этот период ставится задача проверить аналогичность состава подобранных рыб и оценить состояние их здоровья. Кормление и содержание в уравнительный период одинаковое в контрольной и опытных группах. Длительность предварительного периода зависит от предшествующих условий: чем больше они отличались от существующих, тем длительнее период. Минимальная длительность – 15 сут.

Переходный период. Продолжается не менее *недели* и служит для постепенного приспособления рыб к условиям опытного режима кормления или содержания. Этот период не обязателен, если в предварительный период не было перестановок рыб из группы в группу, а введение опытного режима кормления и содержания не требует от рыб больших приспособительных перестроек.

Учетный, или главный, период. Это основной период опыта длительностью не менее 1,5–2 мес. С начала учетного периода вводится весь комплекс изучаемых факторов, предусмотренных методикой опыта. Не допускается никаких перестановок рыб. В случае их выбытия в результате несчастных случаев, как правило, удаляют и их аналогов из соседних групп.

Исследования, проводимые по методу периодов и параллельных групп-периодов, преимущественно состоят из *предварительного периода; первого опытного периода; второго, или главного, опытного периода; контрольного, или заключительного, периода.*

Минимальная длительность предварительного периода – 15 сут, переходного – 7–10, первого опытного – 25–30, главного опытного – 30–60 и заключительного – 25–30 сут. Переходный период часто включают между первым и главным опытными периодами, а также после предварительного. Значение переходного периода – постепенное приспособление рыб к условиям опытного режима эксперимента. Изучаемый компонент вводят в рацион в главный период опыта. В заключительный период из рациона исключается данный компонент и рыб переводят на рацион предварительного периода. Этот период часто опускается и нужен для того, чтобы удостовериться в равенстве продуктивных показателей рыб на одном и том же рационе в предварительный период и заключительный и при необходимости введения соответствующих коррективов.

6.3. Классификация методов исследований в рыбоводстве. Сущность методов

Центральным звеном в подготовке и проведении любого эксперимента является методика исследований, т. е. комплекс и последовательность специфических операций над подопытными рыбами. В основе рыбоводных опытов заложен метод сравнения, с помощью которого на основе сходства и равенства между группами всех факторов, за исключением изучаемого, устанавливают его влияние. При этом один из вариантов опыта принимается за контрольный, а остальные – за опытные.

Применяемые в настоящее время схемы рыбоводных исследований основаны на принципах аналогичных групп и групп-периодов.

При постановке опытов по **принципу групп-аналогов** формируют несколько групп рыб. Этот принцип состоит из методов *обособленных и интегральных групп*. Метод обособленных групп подразделяется на методы: *однойцевых двоен, пар-аналогов, сбалансированных групп-аналогов, мини-стада*, а метод интегральных групп подразделяется на *однофакторный и многофакторный*.

Выбор схемы исследований зависит от цели эксперимента и количества рыб, имеющихся в распоряжении. Наиболее точным методом из перечисленных является *метод однойцевых двоен*, так как в опыте находятся рыбы с одинаковой наследственностью. Преимущество

данного метода состоит в том, что в составе контрольной и опытных групп находятся максимально идентичные рыбы: по генотипу, возрасту, живой массе, телосложению. Поэтому результаты, полученные в опытах с такими рыбами, наиболее объективные, так как на них в наименьшей степени влияют индивидуальные особенности рыб.

Главным недостатком метода является то, что в данном случае очень сложно подобрать рыб в контрольную и опытную группы одинакового пола и необходимого количества. Можно отобрать лишь две группы – контрольную и одну опытную – и, следовательно, изучить в опыте влияние только одного фактора.

Метод пар-аналогов. Данный метод является основным, наиболее универсальным и широко распространенным методом исследований в рыбоводстве. Метод основан на подборе относительно аналогичных рыб в сравниваемые группы. Основное условие: парная структура в организации опыта, строгая фиксация положения в группе каждой рыбы по отношению к рыбам других групп. Число групп зависит от количества изучаемых факторов, причем одна из групп обязательно должна быть контрольной, с которой сравнивают остальные группы. При подборе рыб в группы учитывают породу, породность, пол, происхождение, возраст, живую массу, коэффициент упитанности и др. При этом должна соблюдаться максимальная аналогичность рыб в парах – правильно сформированные группы рыб не должны иметь достоверных различий между собой по всем параметрам отбора. Степень влияния изучаемого фактора определяют по разнице между контрольной и опытной группами рыб. После подбора пар рыб в группы определяют, какая из них будет контрольная, а какая или какие – опытными. Выбор осуществляют рандомизированно, т. е. с помощью жеребьевки. Схема опыта приведена в табл. 6.1.

Таблица 6.1. Схема организации опыта методом пар-аналогов

Группа	Уравнительный период (15 сут)	Переходный период (7–10 сут)	Главный (учетный) период (1,5–2 мес)
Контрольная	ОК	ОК	ОК
Опытная	ОК	Постепенный переход на режим опыта	ОК + изучаемый фактор

Примечание. ОК – основной комплекс.

Метод сбалансированных групп-аналогов. Этот метод применяют в том случае, когда нет возможности отобрать необходимое количество аналогичных пар рыб согласно схеме опыта и нет достаточных

данных об их происхождении. Поэтому для опыта отбирают примерно одинаковых рыб по возрасту, живой массе, т. е. по фенотипическим признакам, причем их должно быть в 1,5–2 раза больше, чем нужно для метода пар-аналогов. Этим компенсируются возможные генотипические различия рыб. В данном методе соблюдается лишь аналогичность сравниваемых групп по их средним показателям в целом, а не аналогичность отдельных пар рыб. Отобранных для опыта рыб по группам распределяют случайным методом (рандомизированно), что является важным методическим моментом.

Метод групп-аналогов достаточно часто применяется в рыбоводных исследованиях и может дать достаточно обнадеживающие результаты только при высокой степени достоверности сравниваемых показателей ($P < 0,05$ и выше). Для глубоких физиологических и биохимических исследований данный метод неприменим.

Метод мини-стада. Если нет возможности провести исследования описанными выше методами, используют метод мини-стада. Его используют преимущественно на племенных рыбах (маточном стаде). Сущность метода состоит в том, что для изучения какого-либо вопроса отбирают большую группу рыб, которая выделяется в производственную единицу. Состав этой группы должен быть копией общего стада по фенотипическим показателям, из которого она выделена, т. е. она должна иметь такую же структуру. Отбор рыб в мини-стадо проводят рандомизированно (т. е. случайно), причем мини-стадо является опытной группой, а основное стадо – контрольной. Формирование поголовья мини-стада осуществляется следующим образом: все поголовье рыб хозяйства (например, карпов) разбивают на группы с учетом возраста, породности, живой массы, плодовитости и т. д., затем от каждой такой группы отбирают по 10–15 % рыб в мини-стадо.

Обычно с помощью данного метода изучают технологические вопросы, а также влияние генетических факторов на плодовитость.

Второй разновидностью метода, основанного на принципе аналогичных групп, является **метод интегральных групп**. Этот метод позволяет получить информацию о влиянии нескольких факторов в одном эксперименте. В данном случае имеется возможность установить влияние их наиболее оптимального соотношения. В исследовательской работе применяется две разновидности данного метода: *двухфакторный* и *многочисленный*.

Метод двухфакторного комплекса (табл. 6.2). С помощью этого метода изучают влияние двух факторов одновременно при разном их уровне. Для этого отбирают необходимое количество групп рыб, в

каждой из которых изучают влияние разных уровней двух факторов (например, в первой группе скармливают рацион с высоким уровнем протеина и низким уровнем углеводов, во второй – наоборот, а в третьей – с низким уровнем того и другого и т. д.). Отбор рыб в группы осуществляют так же, как и при применении метода групп-аналогов.

Таблица 6.2. **Двухфакторный комплекс**

Группа	Изучаемые факторы	
	Уровень протеина	Уровень углевода
I	Высокий	Низкий
II	Низкий	Высокий
III	Низкий	Низкий
IV	Высокий	Высокий

Метод многофакторного комплекса (табл. 6.3). Этот метод применяют, когда необходимо изучить одновременное влияние многих факторов (более двух) при различных их сочетаниях. Метод имеет такую же схему, что и приведенный выше, но включает в себя большее число групп и, следовательно, является более громоздким, что затрудняет работу исследователя.

Таблица 6.3. **Схема проведения опытов с использованием метода интегральных групп. Многофакторный комплекс**

Группа	Изучаемые факторы		
	Уровень протеина	Уровень углевода	Уровень жира
I	Низкий	Низкий	Низкий
II	Высокий	Низкий	Низкий
III	Низкий	Высокий	Низкий
IV	Высокий	Высокий	Низкий
V	Низкий	Низкий	Высокий
VI	Высокий	Низкий	Высокий
VII	Низкий	Высокий	Высокий
VIII	Высокий	Высокий	Высокий

Второй принцип зоотехнических исследований – принцип **групп-периодов**. Здесь выделяют методы: *периодов, параллельных групп-периодов, обратного замещения (стандартный и без контрольной группы), повторного замещения (двукратный и многократный), латинского квадрата (стандартный и по Лукасу)*.

Метод периодов (табл. 6.4). Опыт проводят на одной группе и изучают влияние какого-либо фактора в течение нескольких последова-

тельных периодов. Опыты следует проводить на рыбах, закончивших рост, чтобы исключить влияние возрастного фактора. Весь опыт делят на несколько периодов. В первый период изучают плодовитость рыб, или темп роста, или другой показатель в обычных условиях (в кормленческом опыте – на основном рационе), во второй период в основной рацион вводят изучаемый фактор и судят о его влиянии на изучаемый показатель. В третий период рыб вновь переводят на основной рацион и устанавливают, действительно ли изменения в хозяйственно полезных признаках были вызваны действием изучаемого фактора, а не случайным стечением обстоятельств.

Таблица 6.4. Схема проведения опытов методом периодов

Предварительный период (15 сут)	Первый опытный период (25–30 сут)	Второй (главный) опытный период (30–60 сут)	Переходный период (15 сут)	Заключительный (контрольный) период (25–30 сут)
ОР	ОР	ОР + изучаемый фактор	ОР	ОР

Примечание. ОР – основной рацион.

Преимущество данного метода заключается в том, что опыты проводят на одних и тех же рыбах, следовательно, исключается влияние индивидуальных особенностей рыб. Недостатки метода – относительно короткие сроки проведения опыта, трудности учета влияния одного рациона на другой. На результаты исследований может влиять так называемый фактор времени, т. е. изменения погодных условий, физиологического состояния (возрастные изменения, изменения, связанные с фазами цикла размножения, и др.). Поэтому данный метод чаще используется при постановке относительно коротких кормленческих опытов.

Метод параллельных групп-периодов (табл. 6.5). Этот метод применяют для сравнительного изучения влияния нескольких факторов. Для изучения влияния отдельного фактора выделяют отдельную группу, т. е. от числа изучаемых факторов будет зависеть количество групп. Здесь возможна независимая оценка влияния каждого изучаемого фактора в отдельности, а также сравнение их относительной эффективности, если опытные группы рыб комплектовались аналогичными рыбами. Применяется редко и главным образом в краткосрочных опытах по кормлению.

Таблица 6.5. Организация опыта методом параллельных групп-периодов

Группа	Предварительный период (15 сут)	Первый опытный период (25–30 сут)	Второй опытный (главный) период (30–60 сут)	Заключительный (контрольный) период (25–30 сут)
I	ОР	ОР	ОР + изучаемый фактор	ОР
II	ОР	ОР	ОР + изучаемый фактор	ОР

Метод групп-периодов с обратным замещением. Данный метод объединяет два вышеприведенных метода. Имеет два варианта: *стандартный* (табл. 6.6) и *без контрольной группы* (табл. 6.7). В первом варианте вводят контрольную группу, во втором – исключают ее. При данном методе сравнивают изучаемые показатели в двух направлениях: между группами рыб и между периодами опыта, что обеспечивает получение наиболее достоверных данных. Между первым и вторым (главным) периодами опыта иногда вводят переходный период. Во втором варианте опыта (без контрольной группы) исключают контрольную группу, однако вводят дополнительный контрольный (заключительный) период.

Таблица 6.6. Схема организации опыта методом групп-периодов с обратным замещением (стандартный)

Группа	Подготовительный (уравнительный) период (15 сут)	Переходный период (15 сут)	Первый опытный период (30–60 сут)	Второй опытный период (30–60 сут)
I – контрольная	ОР	Постепенный переход на режим опыта	ОР	ОР
II – опытная	ОР		ОР + фактор А	ОР + фактор Б
III – опытная	ОР		ОР + фактор Б	ОР + фактор А

Таблица 6.7. Схема организации опыта методом групп-периодов с обратным замещением (без контрольной группы)

Группа	Подготовительный (уравнительный) период (15 сут)	Переходный период (7–10 сут)	Опытный период		Контрольный период (25–30 сут)
			I (30–60 сут)	II (30–60 сут)	
I опытная	ОР	ОР + А	ОР + А	ОР + Б	ОР + А
II опытная	ОР	ОР + Б	ОР + Б	ОР + А	ОР + Б

Метод повторного замещения (табл. 6.8). Этот метод разработан для того, чтобы многократно оценить справедливость полученных в опыте результатов и учесть влияние фактора времени. Данный метод сочетает достоинства группового метода и метода периодов и позволяет многократно сравнивать полученные результаты. Чаще всего этот метод используется при постановке опытов по кормлению.

Сущность метода состоит в следующем. Формируют 3 группы рыб по 10 экз. в каждой, причем одна из них контрольная. В подготовительный период опыта рыбы контрольной и опытных групп получают основной рацион и по 50 % из двух изучаемых видов корма. Основной период опыта делят на 6 подпериодов, и в каждый из подпериодов контрольная группа получает тот же рацион, а опытные группы – попеременно один из изучаемых видов корма. Поэтому за основной период опыта каждый вид корма будет изучен 3 раза, а в целом по двум группам – 6 раз. Таким способом достигается трехкратная повторность. При необходимости изучения большего, чем двух, количества факторов формируют соответствующее количество опытных групп (т. е. по группе на фактор) и соответственно увеличивают количество подпериодов в основном периоде опыта. Группы формируют по принципу пар-аналогов или групп-аналогов.

Таблица 6.8. Проведение опытов методом повторного замещения

Период опыта	Группа		
	контрольная	I опытная	II опытная
Подготовительный (20 дн.)	OP + 50 % A + 50 % Б		
Основной (120 дн.):			
I опыт (20 дн.)	OP + 50 % A + 50 % Б	OP + 100 % A	OP + 100 % Б
II опыт (20 дн.)		OP + 100 % Б	OP + 100 % A
III опыт (20 дн.)		OP + 100 % A	OP + 100 % Б
IV опыт (20 дн.)		OP + 100 % Б	OP + 100 % A
V опыт (20 дн.)		OP + 100 % A	OP + 100 % Б
VI опыт (20 дн.)		OP + 100 % Б	OP + 100 % A
Заключительный (20 дн.)	OP + 50 % A + 50 % Б		

Метод латинского квадрата. Этот метод является дальнейшим развитием метода групп-периодов и позволяет на небольшом числе рыб провести опыты по оценке действия различных факторов на хозяйственно полезные признаки рыб и получить достоверные результаты. Имеет два варианта: *стандартный* и *по Лукасу*. Суть стандартного метода латинского квадрата (табл. 6.9) состоит в том, что действие изучаемого фактора оценивается индивидуально, на каждой рыбе.

При постановке опыта по данной схеме необходимо учитывать следующие положения:

1. Число периодов должно соответствовать числу групп или факторов.
2. Число рыб в группах должно быть кратным числу периодов опыта.
3. Все рыбы, поставленные на опыт, должны быть сохранены до конца опыта. В противном случае математическая обработка будет сильно затруднена.
4. Для комплектования групп подбираются сходные по биологическим качествам рыбы, а их распределение по группам производится случайно.

Таблица 6.9. Схема проведения опытов методом латинского квадрата (стандартный)

№ рыбы	Период			
	предварительный	I	II	III
1	OP	OP + A	OP + B	OP + B
2	OP	OP + B	OP + B	OP + A
3	OP	OP + B	OP + A	OP + B

Схема метода латинского квадрата по Лукасу (табл. 6.10) отличается от традиционной тем, что позволяет устранить последствие изучаемого фактора путем введения дополнительного экстрапериода, который является повторением последнего периода опыта.

Таблица 6.10. Схема проведения опытов методом латинского квадрата (по Лукасу)

№ рыбы	Период				
	предварительный	I	II	III	заключительный
1	OP	OP + A	OP + B	OP + B	OP + A
2	OP	OP + B	OP + B	OP + A	OP + B
3	OP	OP + B	OP + A	OP + B	OP + B

7. МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОКРАСКИ РЫБ

1. Готовим специальный бокс. Для того чтобы его изготовить, понадобится картонная коробочка размером 40×30 см (рис. 7.1). Нужно обрезать верхние края, а в дне коробочки по центру проделать небольшое отверстие (4×4 см) под объектив фотоаппарата.



Рис. 7.1. Картонная коробочка для изготовления бокса для опыта

2. Теперь для освещения нужно прикрепить светодиодную ленту по периметру коробки на высоте 20–25 см. Прикрепить ленту можно двусторонним скотчем или тонкой проволокой, продев ее сквозь стенки коробки. Проделать отверстие, чтобы вывести шнур с розеткой. Бокс готов (рис. 7.2).



Рис. 7.2. Готовый бокс для опыта

3. Чтобы подготовить рыбу для фотосъемки, ее нужно обездвигить или зафиксировать. Можно использовать анестезию или кювету со стеклом.

Для анестезии разводим лидокаин 2%-ный в воде, где содержится рыба, концентрация – 100–120 мг/л (рис. 7.3).



Рис. 7.3. Анестетик

4. Строго контролируем состояние рыбы. Примерно спустя 15–20 мин, когда она запрокидывается набок, дыхание становится медленным, реакция на внешние раздражители отсутствует, рыба готова к сьемке (рис. 7.4).



Рис. 7.4. Готовность рыбы к сьемке

Важно использовать компрессор для аэрации воды во время анестезии. Действовать нужно оперативно, чтобы не умертвить рыбу.

5. Выкладываем рыбу на белый фон, накрываем боксом так, чтобы она оказалась по центру (рис. 7.5). Рыба остается освещенной только искусственным светом. И, что важно, каждый экземпляр освещается одинаково.

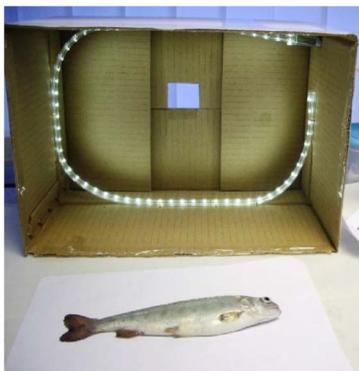


Рис. 7.5. Рыба перед съемкой

6. В проем для объектива помещаем фотоаппарат (рис. 7.6). Съемку делаем без фотовспышки и в режиме макросъемки.



Рис. 7.6. Цифровой фотоаппарат для съемки рыбы

7. Рыбу взвешиваем (рис. 7.7). Данные фиксируем в таблице.



Рис. 7.7. Электронные весы

8. Опускаем рыбу в ведро со свежей водой, обогащенной кислородом при помощи аквариумного компрессора (рис. 7.8). Для полного восстановления рыбе понадобится 30–40 мин.



Рис. 7.8. Восстановление рыбы после съемки

9. Вторым способом фиксации рыбы служит кювета и прозрачное стекло (рис. 7.9). Особь вылавливается сачком, взвешивается и кладется в кювету белого цвета, по размеру подходящую для данной рыбы. Высота кюветы – 4–5 см. Накрывается кювета стеклом таким образом, что рыба ограничена в движении. Стекло не касается кожных покровов рыбы, при этом оно не дает ей выпрыгнуть из кюветы.



Рис. 7.9. Фиксация рыбы в кювете под стеклом

10. Кювета накрывается боксом (рис. 7.10), и производится съемка в том же режиме. Данный метод фиксации более дешевый и быстрый, но имеет недостаток: нужно сделать несколько снимков, чтобы уловить удачный, пока рыба не двигается.



Рис. 7.10. Подготовка к съемке

11. Когда отобраны необходимые снимки, каждый снимок помещаем в отдельную папку. Фотографии должны быть в формате JPEG с расширением .jrg или .jpeg.

Запускаем программу FishGui. После запуска приложения необходимо войти в меню Файл → Открыть (Ctrl + O), чтобы выбрать определенную папку, предназначенную для оценки. После этого нажимаем кнопку «START», и программное обеспечение самостоятельно вычисляет свойства изображения (рис. 7.11).

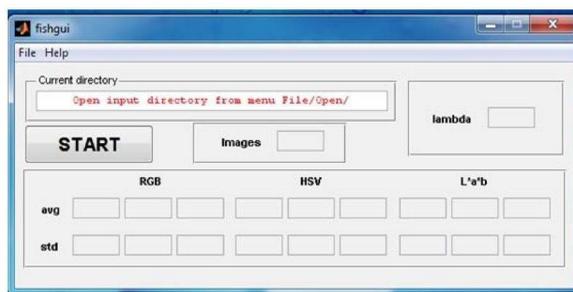


Рис. 7.11. Вычисление свойств изображения

12. После расчета выплывает окно обработки таких параметров, как RGB, HSV и CIELAB (рис. 7.12).

	RGB			HSV			L*a*b		
avg	78	63	39	26	130	78	30	-85	-89
std	30.1	26.13	20.78	6.46	33.87	30.08	11.8	26.25	21.47

Рис. 7.12. Окно обработки параметров изображения

13. Затем рассчитывается доминирующая длина волны, при этом значения могут быть экспортированы в текстовый файл с помощью меню Файл → Сохранить (быстрая клавиша Ctrl + S). Конечным результатом обработки изображения в программе FishGui является получение двух графиков распределения: распределение отдельных цветов в глубине восьмибитового изображения (рис. 7.13) и график гаммы с определением доминирующей длины волны (рис. 7.14).

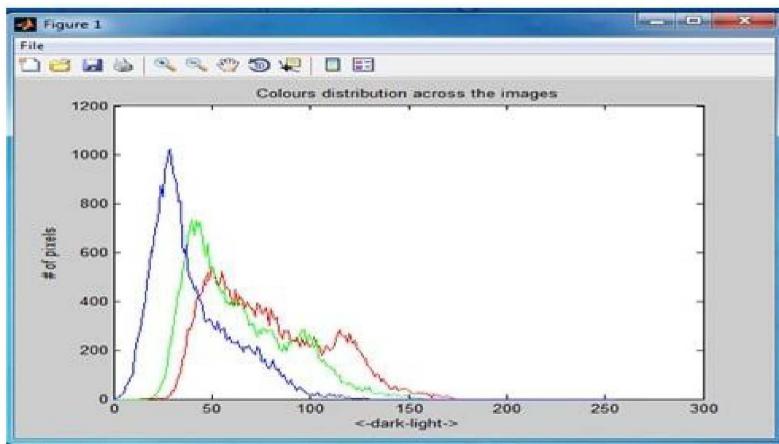


Рис. 7.13. График распределения отдельных цветов в глубине восьмибитового изображения

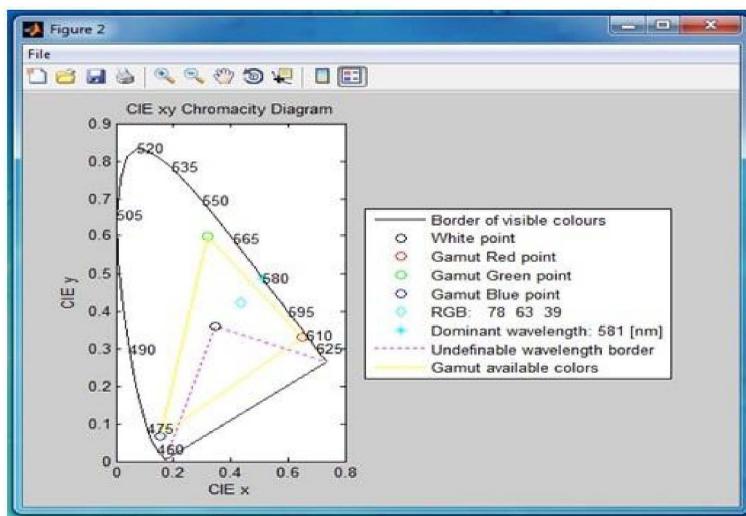


Рис. 7.14. График гаммы с определением доминирующей длины волны

Примеры обработки изображения рыбопосадочного материала радужной форели, построения графика распределения отдельных цветов в восьмибитовом изображении, графика гаммы с определением доминирующей длины волны изображения рыбопосадочного материала радужной форели в программе FishGui для оценки фоновых реакций пигментных клеток показаны на рис. 7.15–7.17.

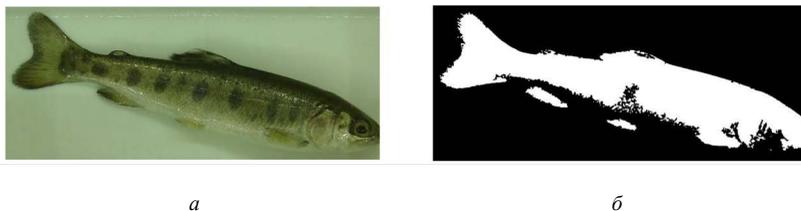


Рис. 7.15. Пример обработки изображения (*a* – до обработки; *б* – после обработки) рыбопосадочного материала радужной форели в программе FishGui для оценки фоновых реакций пигментных клеток

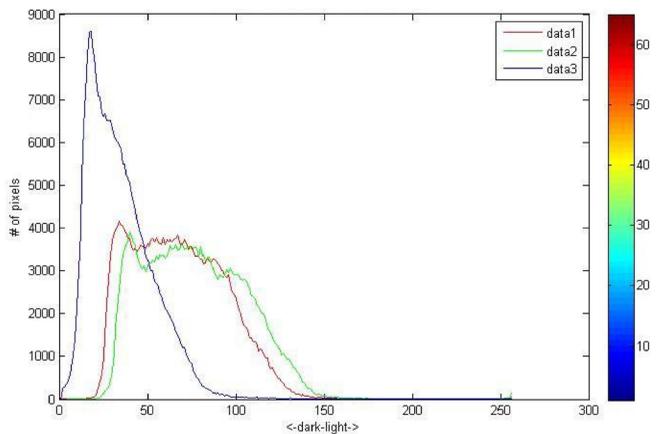


Рис. 7.16. Пример построения графика распределения отдельных цветов в восьмибитовом изображении рыбопосадочного материала радужной форели в программе FishGui для оценки фоновых реакций пигментных клеток

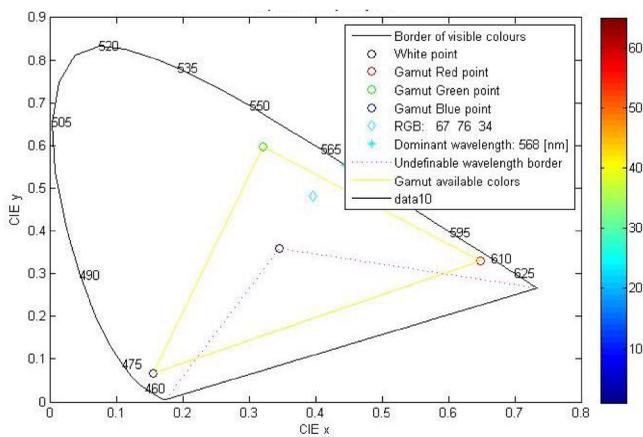


Рис. 7.17. Пример построения графика гаммы с определением доминирующей длины волны изображения рыбопосадочного материала радужной форели в программе FishGui для оценки фоновых реакций пигментных клеток

8. МЕТОДЫ ГИДРОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

8.1. Правила отбора проб воды

Правила отбора проб воды следующие:

- проба должна быть отобрана так, чтобы она соответствовала условиям, наблюдающимся в водоеме;
- отбор пробы, ее хранение, транспортировка и обращение с ней должны проводиться так, чтобы не произошло изменения содержания определяемых компонентов или свойств воды;
- объем пробы должен быть достаточным для определения всех намеченных компонентов.

Место для отбора пробы выбирают в соответствии с целью анализа. Вода озер, водохранилищ и больших по площади прудов неоднородна по своему составу, поэтому пробы отбирают на разных участках и с разных глубин. На рыбоводных прудах должны быть определены стационарные точки для взятия проб воды.

При контроле за зимовкой рыбы пробы отбирают в головном пруду, водоподающем канале, в зимовальных прудах в месте подачи воды из канала и у водоспуска. Горизонт отбора проб зависит от глубины водоема: при небольших глубинах водоема пробы отбираются под поверхностью и у дна (0,2–0,5 м от дна); если водоем имеет значительную глубину, то пробы отбирают на стандартных горизонтах: 0,5, 2, 5, 10 м и т. д.

Время взятия проб воды также имеет значение. В летний период пробы воды желательно брать в утренние часы, когда наблюдается наиболее напряженный газовый режим.

Пробы воды для химического анализа отбирают с помощью специального прибора – батометра (рис. 8.1, 8.2). Батометр представляет собой латунный полый цилиндр с открывающимся дном и верхней крышкой. При взятии пробы батометр с открытым дном и крышкой опускают в воду (рис. 8.3). На заданной глубине встряхивают трос-веревку, и батометр захлопывается, в нем остается проба воды с заданной глубины.

Пробы воды для определения кислорода помещают в специальные кислородные склянки и фиксируют сразу же на месте отбора. Одновременно из батометра берется вода для определения CO_2 и pH.



Рис. 8.1. Батометр



8.2. Батометр с двумя цилиндрами



8.3. Опускание батометра в воду

8.2. Определение физических свойств воды (температура, прозрачность, цвет, запах, вкус)

Температура определяет и растворимость газов в воде. Температура воды значительно устойчивее, чем воздуха, что связано с большой удельной теплоемкостью воды. В прудах температура воды изменяется в зависимости от времени года, климатических условий, времени суток. Температуру воды измеряют специальными термометрами с делениями $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Термометр (в металлической оправе с чашечкой) крепят

на размеченном тросике и опускают на определенную глубину на 5 мин, затем поднимают на поверхность и определяют температуру.

Прозрачность – одно из важных физических свойств воды. Степень прозрачности воды зависит от количества взвешенных и растворенных в ней органических и минеральных веществ. В летний период прозрачность в значительной мере зависит от развития водорослей. Значение показателя прозрачности определяется тем, что интенсивность фотосинтеза (являющегося основным источником кислорода в водоеме) зависит от характера распространения света в толще воды. Зная прозрачность воды, можно иметь представление о том, как протекают процессы фотосинтеза в толще воды.

Прозрачность определяют с помощью металлического диска (диск Секки), покрытого белой краской (рис. 8.4). Диск на размеченном шнуре или тросе опускают в воду до тех пор, пока он не исчезнет из поля зрения (рис. 8.5, 8.6), и поднимают его, пока он снова не станет заметным (рис. 8.7). Средняя величина между этими показателями в сантиметрах или метрах будет считаться прозрачностью воды. Оптимальной считается прозрачность, составляющая $\frac{1}{3}$ глубины водоема.

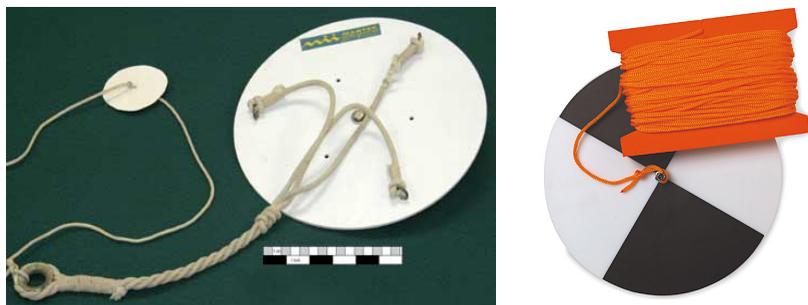


Рис. 8.4. Диск Секки

Цвет воды является показателем некоторых ее химических и биологических особенностей. Чаще всего цвет воды зависит от количества растворенных в ней органических веществ. Окраска воды сама по себе, по-видимому, не играет роли в жизни водных организмов. Однако изменения ее в ряде случаев могут служить показателем неблагоприятных условий в водоеме.



Рис. 8.5. Опускание диска Секки в воду

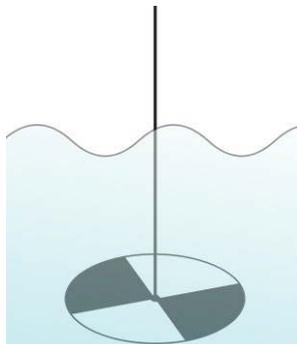


Рис. 8.6. Диск Секки в воде



Рис. 8.7. Видимость диска Секки

Цвет воды выражается в условных единицах – градусах платино-кобальтовой шкалы. Измеряют цвет воды сравнением исследуемого раствора со стандартной шкалой. Цветность наиболее подходящего стандарта и будет цветностью испытуемой воды. Цветность более 30° считается высокой, и вода с такой цветностью обычно не рекомендуется для водоснабжения рыбоводных прудов.

При анализе визуальным, органолептическим и турбидиметрическим методами (определение запаха, вкуса, цветности, мутности, концентрации сульфат-анионов) выполняющий анализ должен уметь корректно определять вкус, запах, цвет, степень мутности, используя собственные вкусовые ощущения, обоняние и зрение.

8.3. Особенности выполнения анализа колориметрическими (спектрометрическими) методами

Колориметрическим (от англ. *colour* – цвет) называется метод анализа, основанный на сравнении качественного и количественного изменения потоков видимого света при их прохождении через исследуемый раствор и раствор сравнения. Определяемый компонент при помощи химико-аналитической реакции переводится в окрашенное соединение, после чего измеряется интенсивность окраски полученного раствора. При измерении интенсивности окраски проб с помощью прибора фотоколориметра (спектрометра) метод называется фотоколориметрическим (спектрометрическим). Соответственно, при измерении интенсивности окраски визуальным способом (например, оценивая интенсивность окраски сравнительно с каким-либо образцом) метод называется визуально-колориметрическим. При помощи колориметрических методов определяют большинство гидрохимических параметров: нитриты, нитраты, аммоний, pH и многие другие.

Для визуального колориметрического метода используют экспресс-тесты (рис. 8.8, 8.9).



Рис. 8.8. Экспресс-тест комплексный



Рис. 8.9. Экспресс-тест для определения нитритов в воде

Для более точных измерений используют *спектрофотометр* (колориметр фотоэлектрический) – прибор, предназначенный для исследований оптической плотности, как правило, и светопропускания растворов.

Источниками света служат, например, две сменные лампы – накаливания, обеспечивающая сплошной спектр в видимой области, и

ртутная, дающая линейчатый спектр в видимой и ультрафиолетовой областях. В качестве приемников света в таком случае выступает пара сурьяно-цезиевых фотоэлементов, включаемых по дифференциальной схеме.

В наборе присутствуют узкополосные светофильтры с различными максимумами пропускания, располагающиеся на поворотной турели. Метод измерений посредством колориметра фотоэлектрического подразумевает попадание пропущенного через светофильтр потока света на призму, делящую его на два луча, проходящие параллельно по кюветам, диафрагмам до попадания на приемники.

Исследования плотности производят вращая барабан привода щели, изменяя размер которой достигают равенства световых потоков, индицируемого нуль-индикатором. Колориметр фотоэлектрический отнесен к приборам общего назначения (рис. 8.10).



Рис. 8.10. Фотоэлектрический колориметр

8.3.1. Определение массовой концентрации аммиака и ионов аммония (суммарно)

Перед первым определением необходимо построить градуировочный график и определить калибровочный коэффициент.

Данный метод подходит для прозрачной воды.

Если при определении пробы прибор показывает значение оптической плотности 20,00 либо показание его нестабильно (сильно прыгает), необходимо разбавить воду перед определением.

Сущность метода. Метод основан на способности аммиака и ионов аммония образовывать окрашенное в желто-коричневый цвет соединение с реактивом Несслера. Интенсивность окраски раствора, пропорциональная массовой концентрации аммиака и ионов аммония, измеряется на фотоколориметре при длине волны 400–425 нм.

Нижний предел обнаружения – 0,05 мг NH_4 в 1 дм^3 . При содержании в воде NH_4 более 3 мг/ дм^3 пробу следует разбавлять. Относительная ошибка определения $\pm 5\%$.

Подготовка к анализу.

Приготовление основного стандартного раствора. 2,965 г (2965 мг) хлористого аммония (NH_4Cl), взвешенного с погрешностью не более 0,0005 г (0,5 мг), растворяют в мерной колбе вместимостью 1000 см^3 в небольшом количестве безаммиачной дистиллированной воды и доводят этой же водой до метки (1000 см^3). В 1 см^3 этого раствора содержится 1 мг NH_4 .

Раствор хранят в склянке из темного стекла в течение года, если нет помутнения хлопьев, осадка.

Для навески используют точные весы, например торсионные весы ВТ-500.

Приготовление рабочего стандартного раствора. 50 см^3 основного стандартного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 1000 см^3 и доводят до метки безаммиачной дистиллированной водой. В 1 см^3 этого раствора содержится 0,05 мг NH_4 . Раствор применяют свежеприготовленным.

Приготовление раствора виннокислого калия-натрия (рис. 8.11). 500 г виннокислого калия-натрия ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), взвешенного с погрешностью не более 0,5 г, растворяют в безаммиачной дистиллированной воде и доводят этой водой до 1 дм^3 . Прибавляют 5–10 см^3 реактива Несслера. После осветления раствор не должен содержать ионов аммония, в противном случае прибавляют еще 2–5 см^3 реактива Несслера.

Для удобства можно приготовить $\frac{1}{10}$ порции.



a

б

в

Рис. 8.11. Компоненты для приготовления раствора виннокислого калия-натрия:
a – виннокислый калий-натрий ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$); *б* – безаммиачная
дистиллированная вода; *в* – реактив Несслера

Приготовление безаммиачной дистиллированной воды. Дистиллированную воду проверяют на содержание аммиака (к 5 см^3 воды прибавляют $0,1\text{ см}^3$ реактива Несслера). При обнаружении аммиака (появляется желтоватое окрашивание) дистиллированную воду кипятят в колбе до уменьшения объема на $\frac{1}{3}$ (рис. 8.12).



Рис. 8.12. Кипячение дистиллированной воды
до уменьшения объема на $\frac{1}{3}$

На этой воде готовят реактивы и используют ее при проведении анализа для разбавления пробы.

Проведение анализа. К 50 см^3 исследуемой (или к меньшему объему, содержащему не более $0,15 \text{ мг NH}_4$ и разбавленному безаммиачной водой до 50 см^3) прибавляют 1 см^3 раствора виннокислого калия-натрия, перемешивают, затем прибавляют 1 см^3 реактива Несслера и снова перемешивают (рис. 8.13). Через 10 мин еще раз перемешивают и фотометрируют при длине волны $400\text{--}425 \text{ нм}$ (для примера возьмем 425 нм). По отношению к раствору сравнения (безаммиачной воде, в которую добавлены те же реактивы, что и в пробу) реактив неустойчив, необходимо сразу проводить определения, со временем показания изменяются.



Рис. 8.13. Изменение цвета пробы при добавлении раствора виннокислого калия-натрия и реактива Несслера

Массовую концентрацию аммиака и ионов аммония находят по градуировочному графику или полученный на спектрофотометре результат умножают на калибровочный коэффициент.

Для этого необходимо:

- включить спектрофотометр, провести его калибровку;
- выбрать нужный режим;
- установить необходимую длину волны (в нашем случае 520 нм);
- перелить жидкости из мерных стаканов в кюветы;
- вставить кюветы с холостым и измеряемыми растворами в кюветодержатель;

- обнулить показание на кювете с холостым раствором;
- передвинуть на кювету с пробой для определения оптической плотности воды;
- умножить оптическую плотность на калибровочный коэффициент.

Алгоритм определения массовой концентрации аммиака и ионов аммония с помощью спектрофотометра.

1. Включите спектрофотометр и откалибруйте его. При включении происходит автоматическое тестирование готовности прибора к работе и прогрев 15 мин. После прогрева рекомендуется провести его калибровку.

По окончании автотестирования и прогрева на экране появится вопрос о необходимости калибровки прибора. Для этого необходимо выбрать «Yes» с помощью клавиши <Λ> и нажать <ВВОД>. После чего прибор начнет выполнение процедуры калибровки, по окончании которой раздастся звуковой сигнал.

2. Выберите «Основной режим» (рис. 8.14).

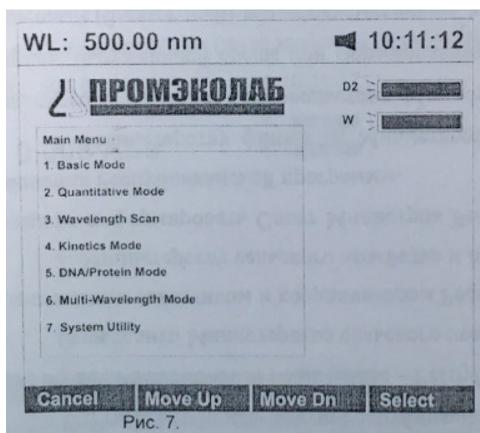


Рис. 8.14. Меню основного режима

Основной режим предназначен для измерений оптической плотности (Abs). Для перехода в «Основной режим», находясь в главном меню, нажмите клавишу <1>. Откроется окно основного режима (рис. 8.15).

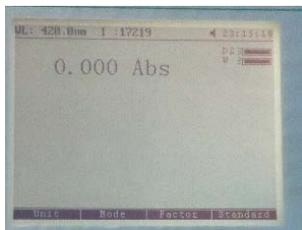


Рис. 8.15. Окно основного режима

3. Установите длину волны. Для этого нажмите клавишу <УСТАНОВКА λ > (рис. 8.16).



Рис. 8.16. Клавиша установки длины волны

Нажимайте клавиши цифр, выставляя нужную длину волны (в нашем случае 425 нм) (рис. 8.17).



Рис. 8.17. Пульт управления спектрофотометром

Подтвердите введенные данные клавишей <ВВОД> (рис. 8.18).



Рис. 8.18. Клавиша для подтверждения введенных данных

На экране отобразится значение длины волны (рис. 8.19).

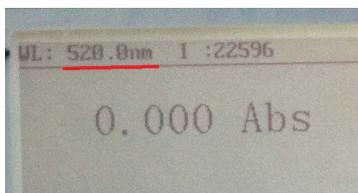


Рис. 8.19. Отображение длины волны (подчеркнуто линией на фото)

4. Перелейте жидкость из мерных стаканов в кюветы (рис. 8.20).



Рис. 8.20. Вода в кюветах, подготовленная для анализа

5. Вставьте кюветы с холостым и измеряемыми растворами в кюветодержатель (рис. 8.21).



Рис. 8.21. Кюветодержатель (слева)

Не забывайте тщательно протирать стенки кювет салфеткой или кусочком ткани, чтобы удалить отпечатки пальцев или капельки жидкости! Закройте крышку кюветного отделения.

6. Обнулите прибор. Для этого, пользуясь рукояткой кюветодержателя, установите кювету с холостым раствором на пути прохождения светового луча и нажмите клавишу <100%T/0Abs> (рис. 8.22).

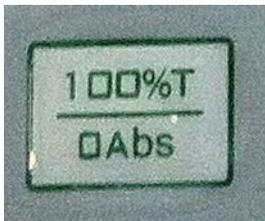


Рис. 8.22. Клавиша для обнуления прибора

На экране появится надпись «Blanking» (рис. 8.23).

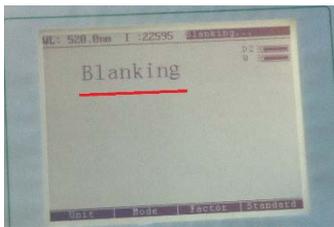


Рис. 8.23. Надпись на экране, указывающая на процесс обнуления

После обнуления на экране должно отражаться нулевое значение оптической плотности (Abs) (рис. 8.24).

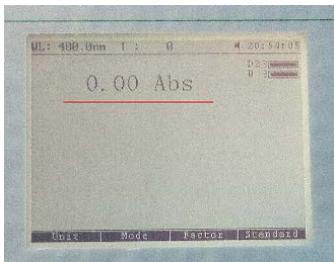


Рис. 8.24. Надпись на экране, указывающая на завершение процесса обнуления

7. Пользуясь рукояткой кюветодержателя, установите кювету с анализируемым раствором (пробой) на пути прохождения светового луча. На экране отобразится измеренное значение оптической плотности пробы (рис. 8.25).

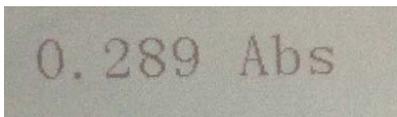


Рис. 8.25. Пример оптической плотности пробы

8. Из найденных значений оптической плотности найдите содержание нитритов.

Например. Найденное значение 0,289 необходимо умножить на калибровочный коэффициент (как его определить, см. пример ниже):

$$0,289 \cdot 7,594 = 2,2 \text{ мг/дм}^3,$$

где 7,594 – калибровочный коэффициент;

2,2 – количество миллиграммов аммиака и ионов аммония в 1 дм³.

Если при определении пробы прибор показывает значение оптической плотности 20.00 (рис. 8.26) либо показание его нестабильно (сильно прыгает), необходимо разбавить воду перед определением, например на $\frac{1}{2}$ ($\frac{1}{2}$ часть пробы + $\frac{1}{2}$ часть дистиллированной воды).

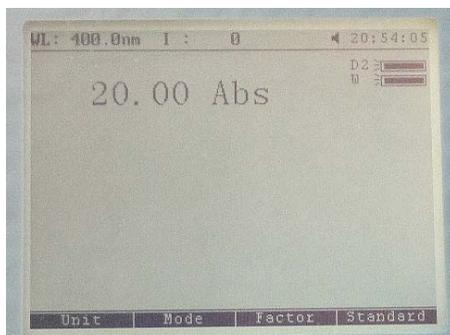


Рис. 8.26. Значение оптической плотности на экране прибора

Однако следует помнить, что при разбавлении воды, например, на $\frac{1}{2}$ мы получим в результате концентрацию аммиака и ионов аммония, равную $\frac{1}{2}$ настоящей концентрации в пробе, поэтому полученные результаты необходимо увеличить (в нашем случае в 2 раза).

Построение градуировочного графика и определение калибровочного коэффициента. Калибровочный график необходимо строить раз в год или же при закупке новых реактивов, работе на другом спектрофотометре.

В мерные колбы вместимостью 50 см³ вносят 0; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 см³ рабочего стандартного раствора и доводят объем до метки безаммиачной водой. Получают растворы с содержанием 0; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 мг NH₄/дм³. Далее проводят анализ и фотомет-

рируют, как при исследовании пробы воды. По полученным результатам рассчитывают калибровочный коэффициент или строят градуировочный график, откладывая по оси абсцисс массовые концентрации аммиака и ионов аммония в миллиграммах на кубический дециметр, а по оси ординат соответствующие значения оптической плотности. График должен иметь прямолинейный характер.

Пример. Для построения графика и определения калибровочного коэффициента в мерные колбы вместимостью 50 см³ вносят 0; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 см³ рабочего стандартного раствора и доводят объем до метки (50 см³) безаммиачной водой. При этом получают растворы с содержанием 0; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 мг NH₄/дм³. После определения оптической плотности (Abs) полученные данные можно преобразовать в таблицу. Для определения калибровочного коэффициента и построения графика таблица может иметь следующий вид.

	Номер пробы	Концентрация, мг/л	Оптическая плотность
	1	0	0,0
	2	0,1	0,012
	3	0,2	0,035
	4	0,5	0,068
	5	1	0,134
	6	1,5	0,214
	7	2	0,251
	8	3	0,379
Сумма		8,3	1,093
К (калибр. коэф.)		8,3 / 1,093 = 7,594	

Для определения калибровочного коэффициента необходимо:

- найти сумму концентраций всех проб (в примере – **8,3**);
- найти сумму оптической плотности всех проб (в примере – **1,093**);
- разделить сумму концентраций всех проб на сумму оптической плотности всех проб (в примере **К = 8,3 / 1,093 = 7,594**).

Для построения градуировочного графика необходимо: по оси ординат разместить данные, полученные в результате определения оптической плотности, а по оси абсцисс указать концентрации всех проб аммиака и ионов аммония в миллиграммах на кубический дециметр, как показано на рис. 8.27.

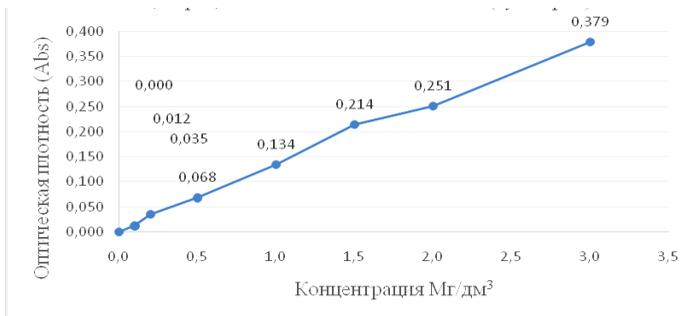


Рис. 8.27. Градуировочный график для определения массовой концентрации аммиака и ионов аммония (суммарно)

8.3.2. Определение массовой концентрации нитритов

Перед первым определением необходимо построить градуировочный график и определить калибровочный коэффициент.

Данный метод подходит для прозрачной воды.

Если при определении пробы прибор показывает значение оптической плотности 20,00 либо показание его нестабильно (сильно прыгает), необходимо разбавить воду перед определением.

Сущность метода. Метод основан на способности нитритов диазотировать сульфаниловую кислоту и на образовании краснофиолетового красителя диазосоединения с α -нафтиламином. Интенсивность окраски, пропорциональная содержанию нитритов, измеряется на фотоколориметре при длине волны 520 нм.

Нижний предел обнаружения – 0,003 мг/дм³ нитритов. При содержании в воде нитритов более 0,3 мг/дм³ пробу следует разбавлять. Относительная ошибка определения $\pm 5\%$.

Мешающее влияние мутности и цветности воды устраняют осветлением пробы гидроокисью алюминия.

Приготовление основного стандартного раствора. 1,497 г (1497 мг) азотистокислого натрия (NaNO_2), взвешенного с погрешностью не более 0,0005 г (0,5 мг), растворяют в мерной колбе вместимостью 1 дм³ (1 л) в небольшом количестве дистиллированной воды и доводят этой водой до метки (1 дм³). В 1 см³ раствора содержится 1 мг нитритов. Раствор консервируют добавлением 1 см³ хлороформа, хранят в склянке из темного стекла в течение нескольких месяцев, если нет помутнения, хлопьев, осадка.

Для навески используют точные весы, например торсионные весы ВТ-500 (рис. 8.28).



Рис. 8.28. Торсионные весы ВТ-500

Приготовление рабочего стандартного раствора. 1 см^3 основного стандартного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 1 дм^3 и доводят до метки (1 дм^3) дистиллированной водой. В 1 см^3 этого раствора содержится $0,001 \text{ мг}$ нитритов. Раствор применяют свежеприготовленным.

Приготовление уксусной кислоты (12%-ный раствор). 25 см^3 ледяной уксусной кислоты (рис. 8.29) разбавляют дистиллированной водой до 200 см^3 (рис. 8.30). Для удобства можно приготовить $\frac{1}{2}$ или $\frac{1}{4}$ порции.



Рис. 8.29. Ледяная уксусная кислота

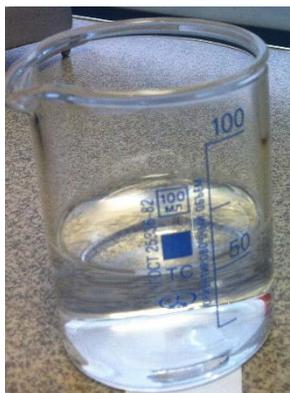


Рис. 8.30. Готовый 12%-ный раствор уксусной кислоты

Приготовление реактива Грисса. 10 г сухого реактива Грисса (рис. 8.31), взвешенного с погрешностью не более 0,1 г, растворяют в 100 см³ 12%-ного раствора уксусной кислоты (рис. 8.32).



Рис. 8.31. Реактив Грисса (сухой)



Рис. 8.32. Готовый реактив Грисса (растворенный в 12%-ном растворе уксусной кислоты)

Проведение анализа. К 50 см³ исследуемой или осветленной пробы (или к меньшему объему, содержащему не более 0,3 мг нитритов, разбавленному дистиллированной водой до 50 см³) прибавляют 2 см³ раствора реактива Грисса, перемешивают (рис. 8.33). Через 40 мин еще раз перемешивают (рис. 8.34) и фотометрируют при длине волны **520 нм** по отношению к раствору сравнения – дистиллированной воде, в которую тоже добавлен реактив Грисса (рис. 8.35).



Рис. 8.33. Пробы воды сразу после добавления 2 см³ раствора реактива Грисса (начали изменять окраску)



Рис. 8.34. Пробы воды спустя 40 мин после добавления 2 см³ раствора реактива Грисса



Рис. 8.35. Раствор сравнения (дистиллированная вода, в которую добавлен реактив Грисса)

Если в пробе воды содержится небольшое количество нитритов, то окрашивание будет слабым.

Массовую концентрацию нитритов находят по градуировочному графику или полученный на спектрофотометре результат умножают на калибровочный коэффициент.

Для этого необходимо:

- включить спектрофотометр, провести его калибровку;
- выбрать нужный режим;
- установить необходимую длину волны (в нашем случае 520 нм);
- перелить жидкости из мерных стаканов в кюветы;
- вставить кюветы с холостым и измеряемыми растворами в кюветодержатель;
- обнулить показание на кювете с холостым раствором;
- передвинуть на кювету с пробой для определения оптической плотности воды;
- умножить оптическую плотность на калибровочный коэффициент.

Алгоритм определения содержания нитритов в воде с помощью спектрофотометра такой же, как и алгоритм определения массовой концентрации аммиака и ионов аммония.

Отличие заключается в значении калибровочного коэффициента.

Например. Найденное значение оптической плотности (0,289) необходимо умножить на калибровочный коэффициент (как его определить, см. пример ниже).

Построение градуировочного графика и определение калибровочного коэффициента. Калибровочный график необходимо строить раз в год или же при закупке новых реактивов, работе на другом спектрофотометре.

В мерные колбы вместимостью 50 см³ вносят 0; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0 см³ рабочего стандартного раствора и доводят объем до метки дистиллированной водой. Получают растворы с содержанием 0; 0,002; 0,004; 0,01; 0,02; 0,04; 0,10; 0,20; 0,30 мг/дм³ нитритов. Далее проводят анализ и фотометрируют, как при исследовании пробы воды. По полученным результатам рассчитывают калибровочный коэффициент или строят градуировочный график, откладывая по оси абсцисс массовые концентрации нитритов в миллиграммах на кубический дециметр, а по оси ординат соответствующие им значения оптической плотности. График должен быть прямолинейным.

Пример. Для построения графика и определения калибровочного коэффициента в мерные колбы вместимостью 50 см³ вносят 0,2; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0 см³ рабочего стандартного раствора и доводят объем

до метки (50 см^3) дистиллированной водой. При этом получают растворы с содержанием 0,004; 0,01; 0,02; 0,10; 0,20; 0,30 мг/дм^3 нитритов. После определения оптической плотности (Abs) полученные данные можно преобразовать в таблицу. Для определения калибровочного коэффициента и построения графика таблица может иметь следующий вид.

Номер пробы	Концентрация, мг/л	Оптическая плотность
1	0,000	0,0
2	0,004	0,003
3	0,01	0,006
4	0,02	0,013
5	0,1	0,071
6	0,2	0,159
7	0,3	0,218
Сумма	0,634	0,47
К (калибр. коэф.)	$0,634 / 0,47 = 1,3489$	
	1,35	

Для определения калибровочного коэффициента необходимо:

- найти сумму концентраций всех проб (в примере – **0,634**);
- найти сумму оптической плотности всех проб (в примере – **0,47**);
- разделить сумму концентраций всех проб на сумму оптической плотности всех проб (в примере **$K = 0,634 / 0,47 = 1,3489$**).

$K = 1,35$.

Для построения градуировочного графика необходимо: по оси ординат разместить данные, полученные в результате определения оптической плотности, а по оси абсцисс указать концентрации всех проб нитритов в миллиграммах на кубический дециметр, как показано на рис. 8.36.

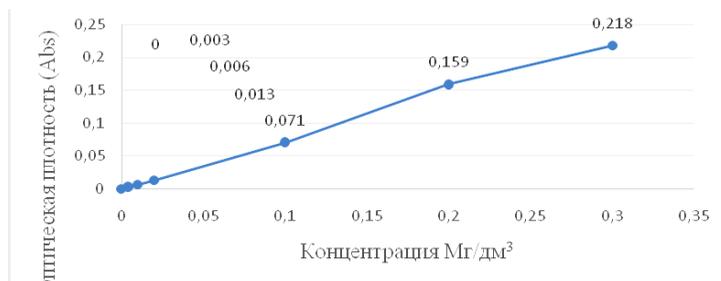


Рис. 8.36. Градуировочный график для определения массовой концентрации нитритов

8.3.3. Определение массовой концентрации нитратов

Перед первым определением необходимо построить градуировочный график и определить калибровочный коэффициент.

Данный метод подходит для прозрачной воды.

Если при определении пробы прибор показывает значение оптической плотности 20.00 либо показание его нестабильно (сильно прыгает), необходимо разбавить воду перед определением.

Приготовление основного стандартного раствора азотнокислого калия. 0,7218 г (721,8 мг) азотнокислого калия (KNO_3) растворяют в дистиллированной воде, добавляют 1 см³ (1 мл) хлороформа и доводят объем до 1 дм³ (1 л).

В 1 см³ раствора содержится 0,1 мг нитратного азота.

Для навески используют точные весы, например торсионные весы ВТ-500.

Приготовление рабочего стандартного раствора азотнокислого калия. 10 см³ основного раствора разбавляют в мерной колбе дистиллированной водой до 100 см³. Применяют свежеприготовленный раствор. В 1 см³ этого раствора содержится 0,01 мг нитратного азота.

Приготовление 0,5%-ного раствора салициловокислого натрия. 0,5 г салициловокислого натрия (рис. 8.37) растворяют в 100 см³ дистиллированной воды (рис. 8.38). Применяют свежеприготовленный раствор.



Рис. 8.37. Реактив
(натрий салициловокислый)



Рис. 8.38. Готовый раствор
0,5%-ного салициловокислого натрия

Приготовление 10 н. раствора едкого натра. 400 г едкого натра, или гидроксида натрия, (NaOH) (рис. 8.39) растворяют в дистиллированной воде и после охлаждения доводят объем до 1 дм³ (1 л) (рис. 8.40). Для проведения опыта хватит $\frac{1}{10}$ порции, т. е. 40 г NaOH растворяют в дистиллированной воде и после охлаждения доводят объем до 100 см³.



Рис. 8.39. Едкий натр (NaOH)



Рис. 8.40. 10 н. раствор едкого натра

Проведение анализа. В одну фарфоровую чашу помещают 10 см³ (10 мл) исследуемой воды, в другую – 10 см³ (10 мл) дистиллированной воды (чаша с дистиллированной водой будет холостым раствором).

Во все чаши прибавляют 1 см³ раствора салициловокислого натрия и выпаривают на водяной бане досуха (рис. 8.41).

После охлаждения сухой остаток в каждой чаше (рис. 8.42) увлажняют 1 см³ концентрированной серной кислоты (рис. 8.43), тщательно растирают его стеклянной палочкой и оставляют на 10 мин. Сухой остаток должен полностью раствориться в кислоте (в чаше с дистиллированной водой после выпаривания осадок наблюдается незначительный).

Затем в чаши добавляют 5–10 см³ дистиллированной воды и переносят в мерную колбу вместимостью 50 см³. Можно использовать мерный стакан вместимостью 50 см³ (рис. 8.44).

Далее в каждый стакан прибавляют по 7 см³ 10 н. раствора едкого натра, доводят объем дистиллированной водой до метки (50 см³) и перемешивают.



Рис. 8.41. Выпаривание на водяной бане



Рис. 8.42. Фарфоровая чаша после выпаривания (на фото виден сухой остаток)



Рис. 8.43. Серная кислота



Рис. 8.44. Мерный стакан вместимостью 50 см³

Через 10 мин после прибавления едкого натра раствор *еще раз перемешивают* и проводят сравнение интенсивности окраски исследуемой пробы фотометрическим методом, измеряя оптическую плотность раствора (рис. 8.45).



Рис. 8.45. Окрашивание пробы спустя 10 мин после добавления 7 см³ 10 н. раствора едкого натра (при большом количестве нитратов в воде)

Для этого необходимо:

- включить спектрофотометр, провести его калибровку;
- выбрать нужный режим;
- установить необходимую длину волны (в нашем случае 400 нм);
- перелить жидкости из мерных стаканов в кюветы;
- вставить кюветы с холостым и измеряемыми растворами в кюветодержатель;
- обнулить показание на кювете с холостым раствором;
- передвинуть на кювету с пробой для определения оптической плотности воды;
- умножить оптическую плотность на калибровочный коэффициент.

Алгоритм определения содержания нитратов в воде с помощью спектрофотометра такой же, как и алгоритм определения массовой концентрации аммиака и ионов аммония.

Отличие заключается в значениях оптической плотности (1,666) и калибровочного коэффициента.

Например. Найденное значение оптической плотности (1,666) необходимо умножить на калибровочный коэффициент (как его определить, см. пример ниже). Добавочный коэффициент равен 4,5 (он постоянен).

Добавочный коэффициент позволяет провести перевод по молекулярной массе нитратного азота в нитраты.

$$1,666 \cdot 6,957 \cdot 4,5 = 52,15 \text{ мг/дм}^3,$$

где 6,957 – калибровочный коэффициент;

4,5 – добавочный коэффициент;

52,15 – количество миллиграммов нитратов в 1 дм³.

Построение градуировочного графика и определение калибровочного коэффициента. Калибровочный график необходимо строить раз в год или же при закупке новых реактивов, работе на другом спектрофотометре.

Для приготовления стандартных растворов в стаканы вместимостью 10 см³ отбирают 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0 и 10 см³ рабочего стандартного раствора азотнокислого калия и доводят дистиллированной водой до метки (10 см³). Содержание нитратного азота в растворах соответственно будет равно: 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0; 10,0 мг/дм³. Затем растворы переносят в фарфоровые чаши, прибавляют по 1 см³ раствора салициловокислого натрия и выпаривают на водяной бане досуха. Сухой остаток обрабатывают так же, как при анализе пробы исследуемой воды. Оптическую плотность окрашенных растворов измеряют так же.

Пример. Для построения графика и определения калибровочного коэффициента были взяты 0,0; 0,5; 2,0; 3,0; 6,0; 10,0 см³ рабочего стандартного раствора азотнокислого калия и обработаны (содержание нитратного азота в растворах будет равно: 0,0; 0,5; 2,0; 3,0; 6,0; 10,0 мг/дм³).

После определения оптической плотности (Abs) полученные данные можно для удобства преобразовать в таблицу. Для определения калибровочного коэффициента таблица может иметь следующий вид.

	Номер пробы	Рабочий раствор, см ³	Концентрация, мг/дм ³	Оптическая плотность
	1 (холостой)	0,0	0,0	0,000
	2	0,5	0,5	0,064
	3	2,0	2,0	0,290
	4	3,0	3,0	0,371
	5	6,0	6,0	0,928
	6	10	10	1,387
Сумма			21,5	2,865
К (коэф. калибр.)				21,5 / 2,865 = 7,5

Для определения калибровочного коэффициента необходимо:

- найти сумму концентраций всех проб (в примере – **21,5**);
- найти сумму оптической плотности всех проб (в примере – **2,865**);
- разделить сумму концентраций всех проб на сумму оптической плотности всех проб (в примере **K = 21,5 / 2,865 = 7,5**).

Для построения градуировочного графика необходимо: по оси ординат разместить данные, полученные в результате определения оптической плотности, а по оси абсцисс указать концентрации всех проб нитратов в миллиграммах на кубический дециметр, как показано на рис. 8.46.

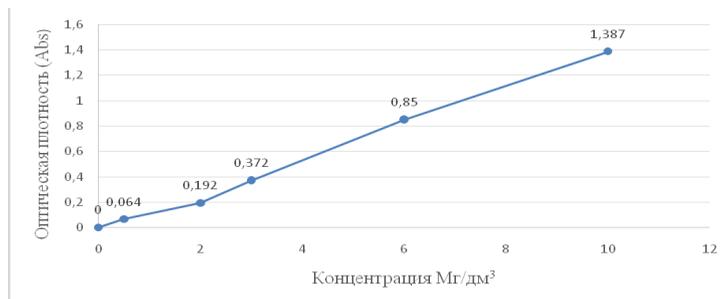


Рис. 8.46. Градуировочный график для определения нитратов

8.4. Особенности выполнения анализа титриметрическим методом

Титриметрический метод анализа основан на количественном определении объема раствора одного или двух веществ, вступающих между собой в реакцию, причем концентрация одного из них должна быть точно известна. Раствор, концентрация вещества в котором точно известна, называется титрантом или титрованным раствором. При анализе чаще всего стандартный раствор помещают в измерительный сосуд и осторожно, малыми порциями, дозируют его, приливая к исследуемому раствору до тех пор, пока не будет установлено окончание реакции. Эта операция называется титрованием. В момент окончания реакции происходит стехиометрическое взаимодействие титранта с анализируемым веществом и достигается точка эквивалентности. В точке эквивалентности затраченное на титрование количество (моль) титранта точно равно и химически эквивалентно количеству (моль) определяемого компонента. Точку эквивалентности обычно определяют, вводя в раствор подходящий индикатор и наблюдая за изменением окраски.

Определение содержания растворенного кислорода титриметрическим методом. Одним из стандартных методов определения кислорода, получивших широкое распространение в гидрохимической практике, является йодометрический метод Винклера. Он основан на взаимодействии гидрата закиси марганца в щелочной среде с кислородом, растворенным в воде. В ходе реакции растворенный кислород связывается и образуются водные окислы марганца высшей валентности. В кислой среде марганец переходит в двухвалентное соединение, окисляя при этом эквивалентное связанному кислороду количество ионов йода. Выделившийся йод оттитровывают с помощью раствора гипосульфита и по количеству его, затраченному на титрование, вычисляют содержание кислорода.

Точное определение концентрации кислорода в воде возможно при соблюдении обязательных правил отбора проб: исследуемую воду берут при помощи батометра или других приспособлений, предохраняющих ее от перемешивания с воздухом. Вода из батометра переносится в специальные кислородные склянки с притертыми пробками, или пикнометры, вместимостью 100–150 мл. Склянку наполняют так, чтобы верхний слой воды, соприкасавшийся с воздухом, вылился. Не закрывая склянку, сразу же вводят в нее 1 мл раствора едкого натра с йодистым калием ($\text{NaOH} + \text{KJ}$) и 1 мл раствора хлористого марганца (MnCl_2). Указанное количество реактивов рассчитано на пробу объе-

мом 100–150 мл. Пипетки с реактивами погружают до половины склянки и затем по мере выливания реактивов поднимают вверх. Для каждого из указанных растворов необходимо иметь отдельные пипетки. В зимнее время фиксацию кислорода можно проводить сразу же после переноса проб в помещение.

После добавления щелочи и хлористого марганца склянку закрывают, следя за тем, чтобы под пробкой не осталось пузырьков воздуха. Содержимое склянки тщательно перемешивают. После фиксации кислорода проба должна некоторое время постоять, с тем чтобы образовавшийся осадок полностью опустился на дно. Как только жидкость над осадком станет прозрачной, склянку открывают и пипеткой вводят 2 мл серной кислоты (1:1), или концентрированной ортофосфорной кислоты, или соляной кислоты. Делают это осторожно, чтобы осадок не поднялся вверх. Склянку закрывают пробкой, и содержимое вновь перемешивают.

Когда осадок полностью растворится, из склянки пипеткой берут 50 или 100 мл исследуемой воды и переносят ее в коническую колбу вместимостью 200–250 мл. Титрование ведут 0,01 н. или 0,02 н. раствором гипосульфита. Содержимое колбы во время титрования необходимо перемешивать. После того как цвет раствора станет слабо-желтым, прибавляют 1 мл свежеприготовленного раствора крахмала. Окрасившуюся в синий цвет пробу дотитровывают с особой осторожностью до полного обесцвечивания. Если кислорода в воде мало и цвет жидкости после растворения осадка кислотой оказался бледно-желтым, а не бурым, крахмал добавляют с самого начала титрования. При этом учитывают все количество гипосульфита, пошедшего на титрование.

Содержание кислорода в воде (мг/л) определяют по следующей формуле:

$$O_2 = \frac{\Pi \cdot K \cdot 0,08 \cdot 1000}{O - o},$$

где Π – количество гипосульфита, пошедшего на титрование, мл;

0,08 – пересчетный коэффициент для выражения результатов в миллиграммах (атомный вес кислорода – 16, грамм-эквивалент – 8, для 0,01 н. раствора 1 мл соответствует 0,08 мг кислорода);

K – поправка на нормальность гипосульфита;

O – объем воды, мл;

o – объем прибавленных реактивов, мл.

Если для титрования используют не весь объем склянки, а берут 50 мл воды, то вычисление ведут по упрощенной формуле:

$$O_2 = 1,6 \cdot П \cdot К.$$

При использовании метода Винклера возможно помимо йодометрического и колориметрическое определение кислорода. Так, по цвету, полученному после добавления в пробу воды раствора реактивов NaOH + KJ, MnCl₂ и H₂SO₄, можно судить о количестве растворенного кислорода. Для этого используют подготовленные стандартные растворы и цветные шкалы, а также колориметрическую кривую для определения на фотоэлектроколориметре.

8.5. Приборы для экспресс-анализа и полевых исследований

Для быстрого и относительно точного измерения параметров воды, особенно в производственных и полевых условиях, используют различные экспресс-приборы: иономеры – для измерения содержания нитрит-ионов, нитрат-ионов, ионов аммония и др.); оксиметры (рис. 8.47) – для измерения концентрации кислорода в воде; рН-метры (рис. 8.48) – для измерения уровня рН в воде.



Рис. 8.47. Оксиметр



Рис. 8.48. рН-метр

Иономер – это анализатор жидкости, в основе принципа функционирования которого лежит использование зависимости в электродной системе электродвижущей силы от активности определяемых ионов.

Чаще всего устройство в цифровой форме и посредством аналогового токового сигнала способно представить результат,

измеренный в ppm – единицах концентрации, и (или) как логарифмическую зависимость рХ. При исследованиях этих величин для соответствующих видов ионов следует применять определенные электроды.

Конструктивно в состав иономера включают, как правило, преобразователь (трансформатор, измерительная плата и лицевая панель, оснащенная клавиатурой и цифровым дисплеем), штатив и электродную систему (измерительный и вспомогательный электроды и устройство температурной компенсации). Принцип действия используемого в научно-исследовательских и лабораторных учреждениях устройства базируется на потенциометрическом методе исследований величин рН и Eh в контролируемых растворах.

Современный иономер может быть скомутирован с компьютером.

Оксиметр (его называют также анализатором кислорода) – это специальный прибор, предназначенный, как правило, для исследования концентраций растворенного в измеряемых средах кислорода.

Принцип действия устройства базируется на электрохимическом методе определения концентраций газов. Посредством диффузии кислород проникает в датчик, на электродах которого появляется электрический ток, определенным образом соотносимый с анализируемой концентрацией. С нагрузочного резистора напряжение передается на автоматизированный цифровой преобразователь, оцифрованный сигнал отображается на дисплее.

В оксиметре может быть также реализован парамагнитный метод пробоотбора, базирующийся на способности кислорода в газообразном состоянии притягиваться к магниту (эффективен при исследованиях сред с большим количеством пара и (или) пыли и при высоких температурах и давлениях). Кроме того, оксиметр способен работать по методу восстановительного плавления пробы и последующего анализа полученных продуктов плавления посредством инфракрасного поглощения.

9. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КРОВИ РЫБ

9.1. Общие требования к работе с кровью рыб

Отбор материала и работа с ним проводятся в спецодежде, одноразовых перчатках. Сгустки крови и сыворотку крови перед утилизацией в общую канализационную сеть обеззараживают только с применением дезинфицирующих растворов (в соответствии с действующими инструкциями по обеззараживанию). Наконечники, микропробирки, пробирки, пипетки и другое оборудование, используемое при работе с кровью и сывороткой крови, обеззараживают в 6%-ном растворе перекиси водорода с экспозицией 3 ч в термостате или сушильном шкафу при температуре 50 °С. После этого промывают под проточной водой, затем 3–5 мин в дистиллированной воде и высушивают в термостате или сушильном шкафу при температуре 60–100 °С в течение 15 мин. Отработанные наконечники, микропробирки, пробирки, пипетки и другое оборудование, используемое при работе с кровью и сывороткой крови, складывают в течение рабочего дня в емкости с дезинфицирующим раствором до полного вертикального погружения. Рабочие поверхности лабораторных столов обеззараживают 70%-ным спиртом с последующим фламбированием. Дезинфекционная обработка приборов (центрифуги, микроскопы, холодильники и др.) проводится 70%-ным спиртом. После каждого контакта с биологическим материалом тщательно моют руки, а использованные одноразовые перчатки утилизируют.

Кровь отбирают в утреннее время, до кормления. Процесс отбора крови должен быть максимально безболезненным и быстрым. Он не должен превышать 30 с. Кровь отбирают в чистые, сухие пробирки.

9.2. Отбор проб крови

Взятие крови из хвостовой вены. При взятии крови из хвостовой вены место пункции находится в точке, образованной при условном пересечении средней линии и линии, идущей перпендикулярно от анального отверстия у сеголеток и от заднего края анального плавника у рыб старшего возраста для карповых и форели (рис. 9.1). У осетровых место пункции находится на брюшной стороне по средней линии позади анального отверстия. При взятии крови отловленную рыбу следует обернуть стерильной салфеткой, место пункции обработать антисептиком. Размер иглы подбирают в зависимости от размера рыбы.



Рис. 9.1. Схема пункции у радужной форели

После того как проколота кожа и игла вошла в мышцы, следует потянуть поршень шприца для создания разрежения в нем. Удерживая шприц таким образом (рис. 9.2), необходимо медленно продвигать иглу по направлению к позвоночнику рыбы. При попадании иглы в вену в канюле шприца появится кровь. После пункции вены следует взять необходимое количество крови, затем иглу извлечь, место пункции обработать антисептиком, рыбу отпустить.



Рис. 9.2. Забор крови из хвостовой вены у стерляди (слева) и радужной форели (справа)

Забор крови из хвостовой культуры. При взятии крови из культуры хвоста срезают спинной и анальный плавники, удаляют чешую, слизь, протирают кожу спиртом, затем отсекают хвостовой стебель по медиальной линии позади анального плавника и собирают кровь в стерильную посуду (рис. 9.3).



Рис. 9.3. Забор крови из хвостовой культы

Взятие крови из сердца. При взятии крови из сердца место укола находится в середине отрезка, соединяющего основание грудных плавников, у форели и чуть выше этой точки у карповых рыб (рис. 9.4). Иглу вводят в место укола под углом 45° относительно фронтальной плоскости (рис. 9.5).

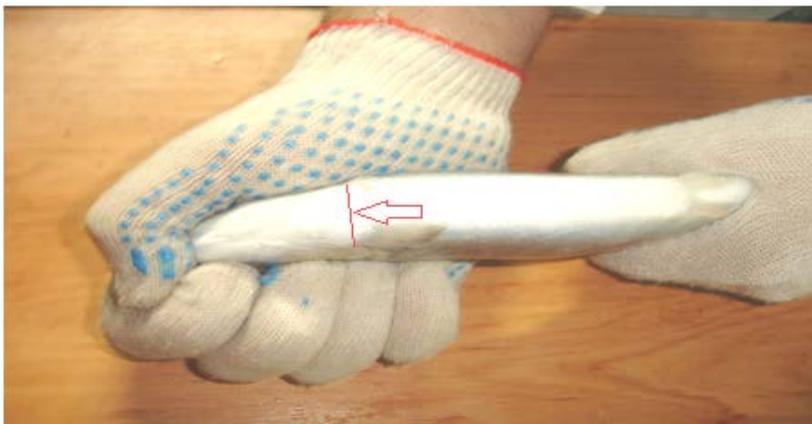


Рис. 9.4. Место пункции при взятии крови из сердца у форели



Рис. 9.5. Взятие крови из сердца у форели

Взятие крови из жаберных вен. При взятии крови из жаберных вен удаляют жаберную крышку и вводят инъекционную иглу в вену у основания одной из жаберных дуг (рис. 9.6).



Рис. 9.6. Взятие крови из жаберной вены

Для биохимического исследования используется сыворотка крови. Для получения сыворотки кровь из шприца после забора ее переливают в пробирку. При этом необходимо кровь из шприца переливать медленно по стенке пробирки для предотвращения гемолиза, т. е. разрушения эритроцитов (рис. 9.7). После помещения крови в пробирку ее маркируют.

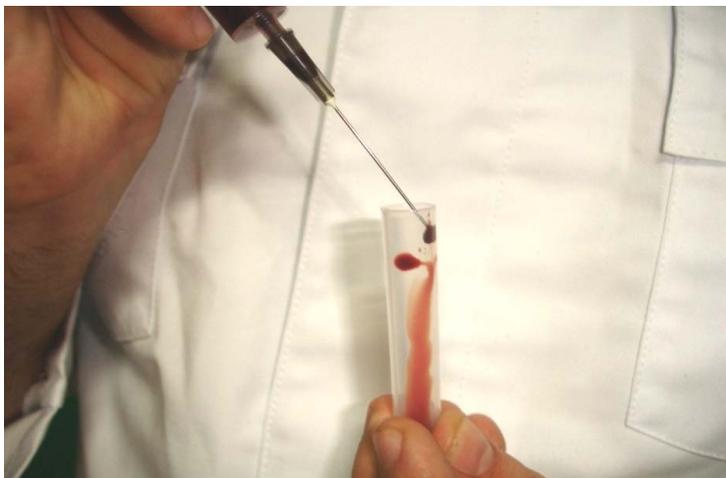


Рис. 9.7. Помещение крови в пробирку

Для получения сыворотки кровь необходимо подвергнуть центрифугированию. После центрифугирования сыворотка оказывается сверху, эритроцитарная масса – снизу (рис. 9.8). Пробирку из центрифуги следует вынимать крайне осторожно во избежание взмучивания эритроцитарной массы (рис. 9.9). Сыворотку откачивают из пробирки шприцем с иглой или с помощью дозатора (рис. 9.10). Захват эритроцитов при этом недопустим, так как при биохимическом исследовании будут получены искаженные данные (рис. 9.11).



Рис. 9.8. Вид крови после центрифугирования

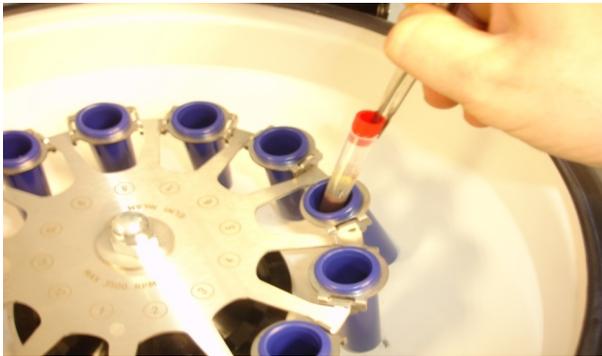


Рис. 9.9. Извлечение пробирки из центрифуги

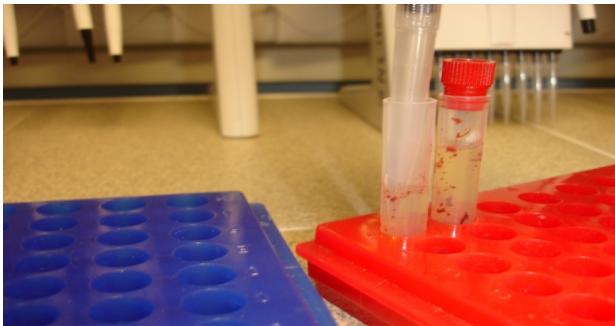


Рис. 9.10. Откачивание сыворотки крови



Рис. 9.11. Внешний вид сыворотки, пригодной для исследования

После получения сыворотку подвергают исследованию при наличии биохимической лаборатории. При отсутствии ее сыворотку замораживают, затем отправляют в лабораторию для исследования. Размораживание сыворотки в процессе транспортировки недопустимо.

9.3. Гормональные исследования. ИФА-анализ

Половые стероидные гормоны играют важную роль на всех стадиях репродуктивного цикла у рыб. При этом в исследованиях репродуктивного цикла осетровых рыб изучают в основном концентрацию следующих гормонов: лютеинизирующий гормон (ЛГ), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), хорионический гонадотропин (ХГ), прогестерон, эстрадиол, тестостерон, дегидроэпиандростерон (ДЭАС), кортизол.

Концентрация половых гормонов в сыворотке крови подвержена значительным колебаниям, при этом у производителей одинакового вида, возраста, пола, гонады которых находятся на одинаковой стадии зрелости, различия в концентрации половых гормонов могут быть существенными.

Тестостерон, являясь основным андрогеном у хрящевых ганоидов (в отличие от костистых рыб, у которых основным мужским половым гормоном является 11-кетотестостерон), кроме синтеза белка и ускорения роста тканей, повышает стимулирующие эффекты гонадотропинов и вовлечен в развитие ооцита во время заключительного созревания (влияет на зародышевый пузырек).

Эстрадиол, стимулируя рост и созревание половых желез самок и поддержание способности их к воспроизводству, вместе с тестостероном через механизм обратной связи влияет на секрецию гонадотропинов. Этот главный эстроген стимулирует синтез белков вителлогенина и зона радиата (*zona radiata*) в гепатоцитах самок рыб. Эстрадиол играет важную роль на стадии поствителлогенеза в развитии ооцита и завершает его созревание.

Прогестерон и его несколько производных секретируются фолликулярным эпителием и, действуя на цитоплазматическую мембрану ооцита, побуждают его перейти к созреванию, поэтому превышение данного показателя у самок является закономерностью.

В настоящее время определение концентрации гормонов в крови рыб осуществляют при помощи иммуноферментного анализа (ИФА), для выполнения которого необходимо соблюдать следующие требования:

- температура помещения должна составлять 18–25 °С;

- дозаторы, используемые для отмеривания растворов, должны проходить регулярную проверку на точность и сходимость результатов пипетирования;
- промывающее устройство для планшетов должно регулярно проверяться на отсутствие неравномерного заполнения лунок отмывочным раствором и (или) его неполное удаление;
- спектрофотометр перед измерением оптической плотности обязательно должен проходить предварительный прогрев, а также должна осуществляться регулярная поверка его;
- при использовании термостата, для исключения подсыхания лунок во время длительной инкубации их заклеивают специальной бумагой для заклеивания планшета, входящей в комплект набора реагентов;
- посуда для приготовления рабочих растворов реагентов должна быть тщательно вымыта;
- перед проведением анализа все компоненты набора, а также используемые разбавители прогреваются до комнатной температуры (18–25 °С).

Общая схема проведения ИФА-анализа представлена на рис. 9.12.

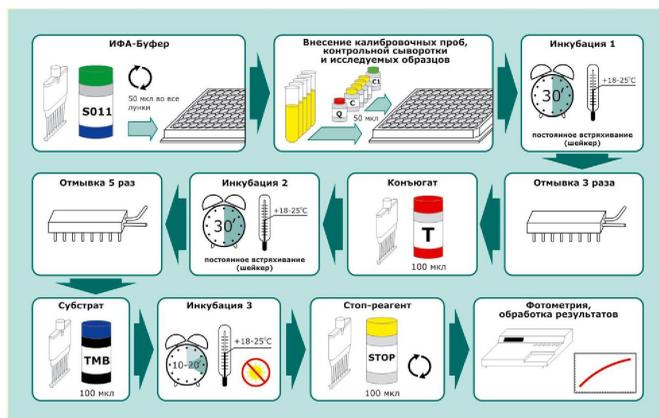


Рис. 9.12. Схема проведения ИФА-анализа

В настоящее время отсутствуют специализированные диагностические наборы для ИФА-анализа концентрации гормонов в сыворотке крови рыб. Поэтому, как правило, в рыбохозяйственных исследованиях используют диагностические наборы, предназначенные для работы с сывороткой крови человека.

Определение лютеинизирующего гормона основано на использовании сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к бета-цепи ЛГ человека. В лунках планшета при добавлении исследуемого образца происходит связывание ЛГ, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышинных моноклональных антител к альфа-цепи ЛГ/ФСГ/ХГ человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации лютеинизирующего гормона в исследуемом образце. Концентрацию лютеинизирующего гормона в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания лютеинизирующего гормона в калибровочных пробах.

Определение фолликулостимулирующего гормона основано на использовании сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к бета-цепи ФСГ человека. В лунках планшета при добавлении исследуемого образца происходит связывание ФСГ, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышинных моноклональных антител к альфа-цепи ЛГ/ФСГ/ХГ человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации фолликулостимулирующего гормона в исследуемом образце. Концентрацию фолликулостимулирующего гормона в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания фолликулостимулирующего гормона в калибровочных пробах.

Определение хорионического гонадотропина основано на использовании сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к β -субъединице хорионического гонадотропина человека. В лунках планшета при добавлении исследуемого образца происходит связывание ХГ, содержащегося в исследуе-

мом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышинных моноклональных антител к альфа-цепи ЛГ/ФСГ/ХГ человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации хорионического гонадотропина в исследуемом образце. Концентрацию хорионического гонадотропина в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания хорионического гонадотропина в калибровочных пробах.

Определение прогестерона основано на использовании конкурентного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к прогестерону. Прогестерон из образца конкурирует с конъюгированным прогестероном за связывание с антителами на поверхности лунки. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации прогестерона в исследуемом образце. Концентрацию прогестерона в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания прогестерона в калибровочных пробах.

Определение эстрадиола основано на использовании конкурентного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы кроличьи поликлональные антитела к эстрадиолу. Эстрадиол из образца конкурирует с конъюгированным эстрадиолом за связывание с антителами на поверхности лунки. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации эстрадиола в исследуемом образце. Концентрацию эстрадиола в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания эстрадиола в калибровочных пробах.

Определение тестостерона основано на использовании конкурентного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к тестостерону. Тестостерон из образца конкурирует с конъюгирован-

ным тестостероном за связывание с антителами на поверхности лунки. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации тестостерона в исследуемом образце. Концентрацию тестостерона в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания тестостерона в калибровочных пробах.

Определение дегидроэпиандростерона-сульфата основано на использовании конкурентного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы кроличьи поликлональные антитела к ДЭАС. Дегидроэпиандростерон-сульфат из образца конкурирует с конъюгированным ДЭАС за связывание с антителами на поверхности лунки. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации дегидроэпиандростерона-сульфата в исследуемом образце. Концентрацию дегидроэпиандростерона-сульфата в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания дегидроэпиандростерона-сульфата в калибровочных пробах.

Определение кортизола основано на использовании конкурентного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к кортизолу. Кортизол из образца конкурирует с конъюгированным кортизолом за связывание с антителами на поверхности лунки. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации кортизола в исследуемом образце. Концентрацию кортизола в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания кортизола в калибровочных пробах.

9.4. Биохимические исследования

В условиях интенсивного индустриального выращивания рыб одним из критериев соблюдения физиологически обоснованных технологий выращивания является оценка функционального состояния произ-

водителей, а именно обмена веществ. Высокие плотности посадки, напряженные гидрохимические условия, длительное голодание в период зимовки, а также рыбоводные манипуляции в нерестовый период и сопутствующие стресс-факторы могут быть основными причинами нарушений обмена веществ в организме производителей.

Наиболее объективным и достоверным для оценки состояния здоровья живого организма является определение лабораторными методами биохимических показателей крови, характеризующих состояние разных видов обмена веществ в организме.

Определение белка в сыворотке крови рыб имеет важное значение для выявления нарушений физиологического состояния, особенно у производителей, так как по этому показателю возможно подтвердить или исключить гипопроотеинемию, которая может наблюдаться у самок и самцов после зимовки из-за длительного голодания.

Следует обратить внимание на то, что этот показатель у самцов-производителей выше, чем у самок. Это может объясняться более интенсивной мышечной нагрузкой в преднерестовый и нерестовый периоды, в результате чего содержание белка может увеличиться до 10 %.

Определение концентрации аминотрансфераз (АсАТ, АлАТ) – ферментов, играющих важную роль в азотистом обмене – необходимо для оценки обменных процессов в живом организме, а также для тестирования работы печени, которая играет важную роль в процессе полового созревания осетровых. Как известно из медицинских справочников, значения активности ферментов, полученные разными методами, могут существенно отличаться друг от друга, даже если они выражены в одних и тех же единицах активности. При этом для каждого вида методик разработаны отдельные нормы, которых имеется несколько десятков. Для рыб, а тем более для осетровых, такого количества норм не существует. Поэтому большое значение (как и в медицинской клинической практике) имеет соотношение активности АсАТ / АлАТ в сыворотке крови (коэффициент де Ритиса).

Важную роль в обеспечении энергетики организма играют циркулирующие в крови углеводы. В отличие от высших водных позвоночных, у рыб колебания сахара в крови очень велики, что связано с несовершенным механизмом регуляции. Определение концентрации глюкозы в крови рыб необходимо для оценки углеводного обмена, синтетической и антитоксической функций печени, для выявления гипо- или гипергликемии. Высокий уровень глюкозы можно рассматривать как индикатор стресс-реакции рыб. Возможно, что таким образом организм рыб реагирует на рыбоводные манипуляции, а также на подъем

температуры. В стрессовых ситуациях у рыб под действием кортизола происходит активация глюкозы, которая обеспечивает увеличение энергетического обмена, что помогает организму рыбы противостоять напряжению (стрессу). Таким образом, концентрацию глюкозы в крови рыб можно рассматривать как индикатор стресса, однако, принимая во внимание, что глюкоза крови не является для рыб жесткой константой гомеостаза, этот показатель нельзя признать универсальным при стрессированности рыбы. Кроме того, в период нереста в крови производителей осетровых рыб происходят закономерные изменения содержания глюкозы и холестерина в сыворотке крови, обеспечивающие необходимый уровень метаболизма и свидетельствующие о высокой адаптационной пластичности этих рыб.

Кальций крови, как один из маркеров оценки зрелости производителей рыб, связывает гликолипопротеиды, а именно белок желточных гранул ооцита – вителлогенин. По результатам изменения концентрации кальция в крови производителей можно делать выводы об интенсивности синтеза вителлогенина у самок рыб, так как степень зрелости ооцитов, концентрация вителлогенина и кальция находятся в довольно тесной взаимосвязи между собой.

Определение концентрации фосфора в крови важно для подтверждения или исключения гипофосфатемии или гиперфосфатемии, что может происходить при нарушении обменных процессов.

При биохимических исследованиях в полученной сыворотке крови определяют активность аспаратаминотрансферазы (AST), щелочной фосфатазы (ALP), аланинаминотрансферазы (ALT), γ -глутамилтрансферазы (GGT), холестерина (Chol), лактатдегидрогеназы (LDH), триглицеридов (TG), кальция (Ca), общего белка (TP), фосфора (P), мочевой кислоты (UA). Все исследования проводились при температуре 25 °С с использованием реактивов фирмы «Cormay».

Биохимические исследования проводятся на свежей сыворотке без следов гемолиза. Антикоагулянты не используют.

Активность определения LDH-1 основана на кинетическом методе, рекомендованном Немецким обществом клинической химии (DGKC), заключающемся в измерении скорости изменения коэффициента поглощения, которая прямо пропорциональна активности LDH-1. В исследованиях используют реактивы фирмы «Cormay» (Liquick Cor-NBDH 30), включающие реактивы 1-NBDH и 2-NBDH, которые осторожно смешивают для приготовления рабочего реактива в соотношении 4:1. Определение активности LDH-1 проводят при температуре 25 °С и длине волны $\lambda = 340$ нм. В ходе исследований используют

метод Sample Star. Для исследования одной пробы приготавливают рабочий раствор в объеме 1000 мкл, который подогревается до температуры определения. Затем добавлялся исследуемый материал в объеме 20 мкл. После тщательного перемешивания по истечении 1 мин отсчитывают коэффициент поглощения относительно воздуха или дистиллированной воды. Измерения повторяют после очередных 1, 2, 3 мин и подсчитывают среднее изменение коэффициента поглощения за минуту. Полученное значение умножают на величину $F = 8095$.

Активность GGT в сыворотке крови определяют на основании кинетической реакции L- γ -глутамил-3-карбокси-4-нитроанилида. Скорость образования 5-амино-2-нитробензоата, измеряемая колориметрически, прямо пропорциональна активности γ -глутамилтрансферазы. В исследованиях используют реактивы фирмы «Cormay» (Liquick Cor-GGT 30), включающие реактивы 1-GGT и 2-GGT, которые осторожно смешивают для приготовления рабочего реактива в соотношении 4:1. Определение активности GGT проводят при температуре 25 и 37 °C и длине волны $\lambda = 405$ нм. В ходе исследований используют метод Sample Star. Для исследования одной пробы приготавливают рабочий раствор в объеме 1000 мкл, который подогревается до температуры определения. Затем добавляют исследуемый материал в объеме 100 мкл. После тщательного перемешивания по истечении 1 мин отсчитывают коэффициент поглощения относительно воздуха или дистиллированной воды. Измерения повторяют после очередных 1, 2, 3 мин и подсчитывают среднее изменение коэффициента поглощения за минуту. Полученное значение умножают на величину $F = 1158$.

Активность определения LDH основана на кинетическом методе, рекомендованном Немецким обществом клинической химии, заключающемся в измерении скорости изменения коэффициента поглощения, которая прямо пропорциональна активности LDH. В исследованиях используют реактивы фирмы «Cormay» (Liquick Cor-LDH 30), включающие реактивы 1-LDH и 2-LDH, которые осторожно смешивают для приготовления рабочего реактива в соотношении 4:1. Определение активности LDH проводят при температуре 25 °C и длине волны $\lambda = 340$ нм. В ходе исследований используют метод Sample Star. Для исследования одной пробы приготавливают рабочий раствор в объеме 1000 мкл, который подогревается до температуры определения. Затем добавляют исследуемый материал в объеме 20 мкл. После тщательного перемешивания по истечении 1 мин отсчитывают коэффициент поглощения относительно воздуха или дистиллированной воды.

Измерения повторяют после очередных 1, 2, 3 мин и подсчитывают среднее изменение коэффициента поглощения за минуту. Полученное значение умножают на величину $F = 8095$.

Оптимизированный и модифицированный метод определения активности AST основан на рекомендациях Международной федерации клинической химии (IFCC), без активации пиридоксальфосфатом. Скорость изменения коэффициента поглощения прямо пропорциональна активности AST. В исследованиях используют реактивы фирмы «Cormay» (Liquick Cog-ASAT 60), включающие реактивы 1-ASAT и 2-ASAT, которые осторожно смешивают для приготовления рабочего реактива в соотношении 4:1. Определение активности AST проводят при температуре 25 и 37 °C и длине волны $\lambda = 340$ нм. В ходе исследований используют метод Sample Star. Для исследования одной пробы приготавливают рабочий раствор в объеме 1000 мкл, который подогревается до температуры определения. Затем добавляют исследуемый материал в объеме 100 мкл. После тщательного перемешивания по истечении 1 мин отсчитывают коэффициент поглощения относительно воздуха или дистиллированной воды. Измерения повторяют после очередных 1, 2, 3 мин и подсчитывают среднее изменение коэффициента поглощения за минуту. Полученное значение умножают на величину $F = 1746$.

Активность определения ALP основана на кинетическом методе, рекомендованном Международной федерацией клинической химии. Скорость образования п-нитрофенола измерялась колориметрически, она прямо пропорциональна активности ALP. В исследованиях используют реактивы фирмы «Cormay» (Liquick Cog-ALP 30), включающие реактивы 1-ALP и 2-ALP, которые осторожно смешивают для приготовления рабочего реактива в соотношении 4:1. Определение активности ALP проводят при температуре 25 и 37 °C и длине волны $\lambda = 405$ нм. В ходе исследований используют метод Sample Star. Для исследования одной пробы приготавливают рабочий раствор в объеме 1000 мкл, который подогревается до температуры определения. Затем добавляют исследуемый материал в объеме 20 мкл. После тщательного перемешивания по истечении 1 мин отсчитывают коэффициент поглощения относительно воздуха или дистиллированной воды. Измерения повторяют после очередных 1, 2, 3 мин и подсчитывают среднее изменение коэффициента поглощения за минуту. Полученное значение умножают на величину $F = 2764$.

Оптимизированный и модифицированный метод определения активности ALT основан на рекомендациях Международной федерации

клинической химии, без пиридоксальфосфата. Скорость изменения оптической плотности прямо пропорциональна активности АЛТ. В исследованиях используют реактивы фирмы «Cormay» (Liquick Cor-ALAT 60), включающие реактивы 1-АЛАТ и 2-АЛАТ, которые осторожно смешивают для приготовления рабочего реактива в соотношении 4:1. Определение активности АЛТ проводят при температуре 25 и 37 °С и длине волны $\lambda = 340$ нм. В ходе исследований используют метод Sample Star. Для исследования одной пробы приготавливают рабочий раствор в объеме 1000 мкл, который подогревается до температуры определения. Затем добавляют исследуемый материал в объеме 100 мкл. После тщательного перемешивания по истечении 1 мин отсчитывают коэффициент поглощения относительно воздуха или дистиллированной воды. Измерения повторяют после очередных 1, 2, 3 мин и подсчитывают среднее изменение коэффициента поглощения за минуту. Полученное значение умножают на величину $F = 1746$.

Метод определения общего белка (TP) основан на биуретовой реакции. Пептидные связи белка в щелочной среде реагируют с ионами меди, образуя окрашенный комплекс. Интенсивность образовавшейся окраски прямо пропорциональна количеству пептидных связей, а тем самым концентрации белка. В исследованиях используют реактивы фирмы «Cormay» (Liquick Cor-TOTAL PROTEIN 60). Определение концентрации TP проводят при температуре 25 и 37 °С и длине волны $\lambda = 546$ нм.

Метод определения концентрации альбумина (Alb) основан на образовании с бромкрезоловым зеленым в сукцинатном буфере (в кислой среде) окрашенного комплекса. Абсорбция образовавшегося комплекса измеряется при длине волны $\lambda = 630$ нм и температуре 25 и 37 °С. В исследованиях используют реактивы фирмы «Cormay» (Liquick Cor-ALBUMIN 60).

Метод определения концентрации общего холестерина (Chol) – колориметрический, энзиматический с эстеразой и оксидазой холестерина. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации холестерина. В исследованиях используют реактивы фирмы «Cormay» (Liquick Cor-CHOL 60). Определение концентрации Chol проводят при температуре 25 и 37 °С и длине волны $\lambda = 500$ нм.

Метод определения концентрации неорганического фосфора основан на реагировании ионов фосфора с молибдат-ионами в кислой среде с образованием комплекса фосфоромолибдата. Коэффициент поглощения образовавшегося комплекса измеряется при длине $\lambda = 340$ нм и

температуре 25 и 37 °С. В исследованиях используют реактивы фирмы «Cormay» (Liquick Cor-PHOSPHORUS 30).

9.4.1. Гематологические исследования

Определение содержания гемоглобина. Гемоглобин – это дыхательный пигмент, содержащийся в эритроцитах. Его количество в организме выражается в граммах на литр и имеет важное диагностическое значение. Определять содержание гемоглобина можно двумя способами: методом Сали и цианметгемоглобиновым методом. Наиболее распространенным и простым является метод определения гемоглобина по Сали. Однако он дает ряд объективных (постепенное усиление окраски) и субъективных (визуальное сравнение цвета) ошибок. Цианметгемоглобиновый метод является наиболее точным.

Метод определения гемоглобина по Сали.

Подготовка к исследованию.

Приготовление 0,1 н. раствора соляной кислоты. На 1 л дистиллированной воды добавляют 8,2 см³ химически чистой соляной кислоты удельным весом 1,19 либо 0,1 н. фиксагал соляной кислоты.

Оборудование и реактивы: гемометр Сали, капиллярная пипетка от гемометра Сали, глазная пипетка, стеклянная палочка, часовое стекло, 0,1 н. раствор соляной кислоты, дистиллированная вода.

Методика определения. Среднюю пробирку гемометра наполняют до нижней отметки 0,1 н. раствором соляной кислоты. Набирают кровь в капилляр до метки (0,02 мл), не допуская попадания пузырьков воздуха, и удаляют излишек ее путем прикладывания фильтровальной бумаги к кончику капилляра. Выдувают кровь на дно пробирки таким образом, чтобы верхний слой соляной кислоты оставался неокрашенным. Не вынимая пипетки, ополаскивают ее соляной кислотой из верхнего слоя. После этого содержимое пробирки перемешивают, ударяя пальцем по ее дну. Точно через 5 мин добавляют по каплям дистиллированную воду, жидкость перемешивают стеклянной палочкой.

Цианметгемоглобиновый фотометрический метод.

Подготовка к исследованию.

Приготовление раствора Драбкина. На 1 л реактива берут: бикарбоната натрия – 1 г, красной кровяной соли – 0,2 г, цианистого калия или натрия – 0,05 г, дистиллированной воды – остальной объем.

Оборудование и реактивы: фотоэлектроколориметр (ФЭК) или спектрофотометр с зеленым светофильтром и кюветами толщиной 1 см, химические пробирки с пробками, капиллярная пипетка от гемо-

метра Сали вместимостью 20 мкл, градуированная пипетка вместимостью 5 мл, раствор Дабкина.

Методика определения и учет результатов. Мерной пипеткой в пробирку наливают 5 мл трансформирующего раствора Дабкина. Пипеткой от гемометра Сали добавляют 20 мкл крови. Содержимое пробирки хорошо перемешивают и оставляют в холодильнике на 20 мин. По истечении этого времени рабочий и трансформирующий растворы наливают в кюветы и, используя зеленый светофильтр, проводят измерения на ФЭКе. Расчет концентрации гемоглобина (г/л) на основе данного определения производят по формуле

$$x = D540 \cdot 367,1,$$

где $D540$ – показания ФЭКе;

$367,1$ – коэффициент пересчета, учитывающий разведение крови, миллимолярную массу гемоглобина и другие показатели.

Определение гематокритной величины. Гематокритное число – это отношение объема эритроцитов к общему объему крови, выраженное в литрах на литр ($1 \text{ л/л} = 100 \%$).

Подготовка к исследованию.

Приготовление растворов антикоагулянтов:

– раствор Геллера и Пауля: на 100 мл воды щавелевокислого аммония – 1,2 г, щавелевокислого калия – 0,8 г;

– 5%-ный раствор трехзамещенного лимоннокислого натрия.

Оборудование и реактивы: микрокапилляры, центрифуга (при массовом отборе проб удобнее использовать специальную центрифугу МГЦ-8), растворы антикоагулянтов: раствор гепарина 1000 ЕД/мл, или 7,7 мг/мл, или раствор Геллера и Пауля, или 5%-ный раствор лимоннокислого натрия.

Методика определения и учет результатов. Микрокапилляры предварительно обрабатывают одним из растворов антикоагулянтов: несколько раз споласкивают их раствором гепарина и высушивают при комнатной температуре или же в капилляры набирают на $\frac{1}{10}$ часть раствора Геллера и Пауля и высушивают в сушильном шкафу при температуре 60 °С. В подготовленные таким образом капилляры набирают кровь. Конец капилляра закупоривают с помощью замазки и ставят центрифугировать до получения постоянного объема эритроцитов. Время центрифугирования зависит от скорости вращения центрифуги. Достигают эффекта полного осаждения эритроцитов. Отсчет объема эритроцитов и плазмы производят с помощью миллиметровой линейки. Процентное отношение столба эритроцитов к высоте всего

столба крови является гематокритной величиной, его переводят в размерность литр на литр.

Определение среднего содержания гемоглобина в одном эритроците (СГЭ). Показатель среднего содержания гемоглобина в одном эритроците очень важен для выявления гипо- и гиперхромии. СГЭ в одном эритроците принято выражать в пикограммах (синоним – микрограмм); $1 \text{ пг} = 1 \cdot 10^{12} \text{ г}$.

Методика определения и учет результатов. СГЭ в одном эритроците определяют делением концентрации гемоглобина в 1 мкл крови, выраженной в грамм-процентах, на число эритроцитов в этом же объеме. Для упрощения расчетов можно разделить содержание гемоглобина, выраженное в граммах на литр, на число эритроцитов в миллионах.

Определение среднего объема эритроцитов. Для выявления наличия микро- и макроцитозов наряду с непосредственным измерением размеров эритроцитов на мазках удобнее косвенно вычислять средний объем эритроцитов, который выражают в кубических микрометрах (мкм^3).

Методика определения и учет результатов. Для определения среднего объема эритроцитов гематокритное число делят на число эритроцитов в 1 мкл крови.

Практически средний объем эритроцитов определяют по формуле

$$A \cdot 1000 / B,$$

где А – гематокритное число, л/л;

В – число эритроцитов, млн/мкл.

Определение скорости оседания эритроцитов. В зависимости от физических и химических свойств крови эритроциты оседают в микрокапиллярах с различной скоростью. Скорость оседания эритроцитов определяется в аппаратах Панченкова и выражается в миллиметрах за 1 ч (мм/ч).

Оборудование и реактивы: часовое стекло, аппарат Панченкова, состоящий из штатива и специальных капиллярных пипеток, на которых нанесена миллиметровая шкала длиной К см; верхнее деление шкалы отмечено буквами О и К (кровь), против деления 50 имеется буква Р (реактив), профильтрованный 5%-ный раствор трехзамещенного лимоннокислого натрия.

Методика определения и учет результатов. Промывают капиллярную пипетку раствором лимоннокислого натрия, затем набирают этот раствор до метки Р и выливают его в часовое стекло. Тем же капилляром набирают кровь 2 раза до метки К и спускают в часовое стекло. Хорошо перемешивают и, набрав смесь в капилляр до метки К, ставят

в штатив на 1 ч. По истечении этого времени определяют скорость оседания эритроцитов. Величину столбика плазмы, освободившегося от эритроцитов, учитывают по делениям на капиллярной пипетке.

При работе с молодой рыб допускается набирать меньший объем крови ($1/2$ или $1/4K$), при этом соотношение лимоннокислого натрия и крови необходимо строго сохранять на уровне 1:2.

Исследование клеток крови. Формула крови.

Приготовление мазков крови. После того как капля крови помещена на предметное стекло (рис. 9.13), ее следует распределить по всей поверхности предметного стекла с помощью шлифованного стекла.



Рис. 9.13. Помещение капли крови на предметное стекло

Для этого шлифованным концом стекла нужно коснуться капли крови под углом 45° , подождать, пока она полностью распределится по всей кромке. После этого быстрым легким движением провести кромкой шлифованного стекла по всей поверхности предметного стекла (рис. 9.14, а). Затем мазок необходимо просушить на воздухе в течение 5–10 мин (рис. 9.14, б).



а



б

Рис. 9.14. Приготовление мазка крови

Качественный мазок должен быть ровным. Капля крови должна быть равномерно распределена по всей длине мазка (рис. 9.15).

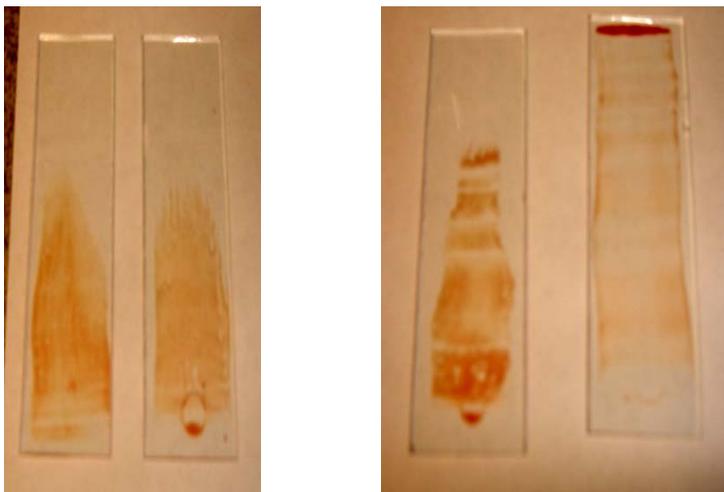


Рис. 9.15 Качественный (слева) и некачественный (справа) мазки

Далее высушенный мазок необходимо погрузить в фиксирующую жидкость на 20–30 мин. В качестве фиксатора применяется метиловый или этиловый спирт (96°).

После этого мазок окрашивается. Окрашивается он по одному из приведенных методов: окраска по Романовскому, по Паппенгейму, по Паппенгейму – Крюкову, по Романовскому – Гимзе, по Маю – Грюнвальду.

Окраска по Романовскому.

Принцип. Окрашивание разных элементов клеток в разные цвета и оттенки смесью основных (азур II) и кислых (водорастворимый желтый эозин) красок.

Оборудование: колба или бутылка вместимостью 1 л; измерительные цилиндры вместимостью 250 мл; цилиндры для разведения красок вместимостью 100 мл; градуированная пипетка; штатив для мазков; кювета со стеклянным мостиком для окраски.

Реактивы. В продаже имеется готовый раствор краски Романовского, а также сухая краска Романовского (Гимзы), из которой приготавливают раствор следующим образом: 3,8 г сухой краски Романов-

ского растворяют в 250 мл чистого метилового или этилового спирта (последний хуже). Раствор оставляют на 3–5 сут, часто взбалтывая для лучшего растворения краски. Затем прибавляют 250 мл чистого глицерина и вновь оставляют на 3–5 сут, периодически взбалтывая. Приготовленная таким образом краска хорошо сохраняется длительное время в темных бутылках в шкафу, где нет ни кислот, ни щелочей.

Готовый или приготовленный раствор красителя Романовского перед употреблением оттитровывают, т. е. окрашивают несколько фиксированных мазков крови в течение 25–40 мин различно разведенной краской (1–2 капли краски на 1 мл дистиллированной воды). По хорошо окрашенному препарату устанавливают нужное количество капель краски на 1 мл воды и время окрашивания.

Методика. Фиксированные мазки укладывают на мостик, состоящий из двух стеклянных палочек, уложенных на два противоположных края кюветы.

Затем мазки заливают разведенной краской, которую наливают на мазок возможно более высоким слоем. Окрашивание длится в зависимости от температуры воздуха в помещении от 25 до 45 мин.

Если температура в помещении низкая или требуется быстрее окрасить мазки, то разведенную краску можно подогреть до 60–70 °С (до кипения доводить нельзя).

После окончания окраски краску смывают (но не сливают) сильной струей воды и ставят мазки вертикально в деревянный штатив для просушивания.

Разведенной краской можно пользоваться только в течение одного дня.

Окраска по Паппенгейму. В этом методе соединяются преимущества окраски по Маю – Грюнвальду и Романовскому – Гимзе. Окраска является комбинированной, суть ее заключается в том, что мазок вначале окрашивается по методу Мая – Грюнвальда, а затем докрасывается по методу Романовского – Гимзы.

Методика. На нефиксированный мазок крови наносят 15–20 капель краски Мая – Грюнвальда и выдерживают в течение 3 мин. Далее к краске добавляют такое же количество дистиллированной воды и после перемешивания оставляют еще на 3 мин. Затем краску сливают, стекло ставят краем на пропускную бумагу, чтобы стекла вода. После этого на невысохший еще мазок наслаивают свежеприготовленную краску Романовского – Гимзы (15–20 капель краски на 10 мл воды) и мазок докрасывают дополнительно 15–30 мин, в зависимости от его давности. По истечении указанного времени краску смывают и мазок

высушивают. Если мазки окрашиваются интенсивно, их можно разбавить дистиллированной водой, выдержать в течение 1 мин, а затем высушить.

Исследование окрашенных мазков крови проводится с применением микроскопов с иммерсионной системой.

Окраска по Паппенгейму – Крюкову.

Принцип. Комбинированная окраска фиксатором-красителем Мая – Грюнвальда и краской Романовского, дающая возможность очень хорошо дифференцировать составные части клеток.

Оборудование: см. «Окраска по Романовскому».

Реактивы:

1) готовый краситель-фиксатор Мая – Грюнвальда, состоящий из озина-метиленового синего в метиловом спирте;

2) свежеприготовленный раствор краски Романовского (1–2 капли краски на 1 мл дистиллированной воды);

3) нейтральная дистиллированная вода.

При отсутствии готового красителя-фиксатора Мая – Грюнвальда его можно приготовить растворением 0,3–0,5 г сухой краски Мая – Грюнвальда в 100 мл чистого метилового спирта с добавлением 50 мл чистого глицерина (или без него).

Краситель в обоих случаях созревает четыре дня при комнатной температуре.

Методика. На нефиксированный мазок наливают пипеткой 10–15 капель готового красителя-фиксатора Мая – Грюнвальда, через 3 мин прибавляют по каплям столько же воды и продолжают окрашивание еще 1 мин, после чего краситель смывают водой и мазок высушивают на воздухе.

Затем на высушенный мазок наливают свежеприготовленный водный раствор красителя Романовского на 8–15 мин в зависимости от температуры в помещении, смывают краску водой и мазок высушивают на воздухе. Данный способ окраски является наилучшим.

Окраска по Романовскому – Гимзе. Для окрашивания используется готовый раствор краски.

Перед употреблением краска разводится из расчета 1–2 капли на 1 мл дистиллированной воды. Зафиксированный препарат помещают мазком вверх на стеклянные палочки над чашкой и покрывают поверхность мазка высоким слоем разведенной краски. Окрашивание можно производить также в кюветах, наполненных раствором краски. Продолжительность окрашивания – 15–30 мин; для свежих мазков и в сухую жаркую погоду времени требуется меньше, чем при окраске

старых мазков или при окраске в сырую и холодную погоду. По истечении определенного времени краску смывают, лучше дистиллированной водой, мазок для высушивания ставят вертикально на пропускную бумагу. Высушивание мазка можно производить подогреванием на руке.

Методика. При окрашивании по методу Романовского – Гимзы необходимо соблюдать ряд условий, чтобы получить правильную окраску:

- 1) вода должна иметь рН 6,6–6,8;
- 2) посуда, в которой разводится краска, должна быть чистой;
- 3) раствор краски готовится перед окраской (*extempore*), а не заранее, так как наилучшее окрашивание получается в момент разбавления алкогольного раствора водой;
- 4) краску следует добавлять в воду по каплям, а не наливать сразу;
- 5) концентрация раствора не должна превышать 3 капли на 1 мл;
- 6) для получения красивой дифференциальной окраски рекомендуется оставлять дистиллированную воду на мазке после промывки в течение 1 мин.

Правильная окраска определяется по внешнему виду. Макроскопически мазок должен быть окрашен в розоватый цвет с незначительным фиолетовым оттенком. Серые или серо-голубые мазки указывают на избыток щелочи, ярко-красные – на избыток кислоты или слишком кратковременное окрашивание.

Метод Романовского – Гимзы особенно хорош при окрашивании мазков на наличие кровепаразитов, а также при окрашивании одновременно нескольких мазков.

Окраска по Романовскому – Гимзе в модификации Филипсона. Для окрашивания по этому методу требуется особое приготовление краски, которое можно производить заранее, но можно и в момент окрашивания. Берется одна часть жидкой краски Романовского и три части этилового спирта (ректификата). После смешивания со спиртом краска сразу же пригодна для употребления.

Методика. На нефиксированный мазок крови наносится 10–15 капель приготовленной вышеуказанным способом краски. Через 10–15 мин, необходимых для фиксации мазка, наливается примерно 0,5–1 мл дистиллированной воды, которая тщательно смешивается с краской. Окрашивание мазка продолжается в течение 20–30 мин (длительность периода окрашивания изменяется в зависимости от температуры воздуха, качества краски и некоторых других причин и может

быть установлена в каждой лаборатории самостоятельно). Затем краска смывается дистиллированной водой и мазок высушивается. Высохший мазок годен для исследования.

Окраска по Маю – Грюнвальду. Окрашивание производится готовым раствором краски Мая – Грюнвальда.

Методика. На нефиксированный мазок крови наносят 15–20 капель краски и оставляют на нем в течение 3 мин. По истечении указанного времени на мазок наслаивают такое же количество капель дистиллированной воды (15–20 капель). Краску хорошо перемешивают с водой с помощью стеклянной палочки, и докрашивают мазок еще 10–15 мин. Далее промывают его дистиллированной водой и высушивают.

Подсчет элементов красной крови. Преобладающей клеточной формой крови рыб являются эритроциты. Форма зрелых клеток красной крови – эллипсоидная, диаметр – 5×15 мкм ($4,5 \times 7,0$ – $12,0 \times 18,0$). В центре расположено несколько вытянутое ядро темно-фиолетового цвета. Цитоплазма этих клеток, благодаря наличию гемоглобина, оксифильная, розовато-желтого цвета. Зрелые эритроциты здоровых рыб всегда одинаковы по величине.

Разнообразие размеров (анизоцитоз) является признаком патологии. В то же время пойкилоцитоз (отклонение формы эритроцитов от нормы), если он не носит массового характера, не всегда свидетельствует о патологии: эритроциты в процессе движения вращаются вокруг короткой и длинной своих осей, сталкиваются, деформируясь, несколько изменяя форму.

При оценке эритропоеза определяется процентный состав незрелых эритроцитов. Цитоплазма их окрашена более базофильно, ядра значительно светлее, рыхлые, крупные. Чем клетка менее зрелая, тем базофильнее ее цитоплазма, тем светлее, крупнее и рыхлее ядро. Совсем молодые эритроциты округлы, ядра у них большие и круглые.

Методика подсчета незрелых эритроцитов следующая: подсчитывается по всему мазку (в разных его участках) 500 эритроцитов и среди них отмечается количество незрелых форм, которое выражается в процентах, где за 100 % принимается общее количество подсчитанных на мазке эритроцитов.

Подсчет элементов белой крови. Лейкоцитарную формулу определяют, подсчитывая в окрашенных мазках крови рыб 200 лейкоцитов, и выражают в виде процентного соотношения отдельных видов лейкоцитов. Ввиду того что более крупные формы клеток (моноциты, нейтрофилы, миелобласты) располагаются больше по периферии, вдоль

наружных краев мазка, а более мелкие (лимфоциты, микромиелобласты) находятся ближе к центру, клетки подсчитывают всегда по одной и той же определенной системе: одну половину клеток считают на одном конце мазка по зигзагообразной линии, другую половину – на другом конце по этому же принципу. Лучше двигаться по самым тонким, наиболее прозрачным местам мазка, в которых хорошо просматривается структура клеток. Особенно важно придерживаться указанного правила подсчета при патологических изменениях крови, выявить которые при этом будет значительно легче. Процентное соотношение клеток белой крови подсчитывается с помощью 11-клавишного счетчика для лейкоформулы. Изучая белые клетки, учитывают сдвиги ядер нейтрофилов – индекс сдвига ядер. Повышение процента незрелых нейтрофильных клеток в периферической крови называется сдвигом влево. Снижение количества палочкоядерных нейтрофилов и присутствие нейтрофилов с гиперсегментированными ядрами определяется как сдвиг вправо. Для выяснения отклонения в гематологических параметрах применяется показатель индекса сдвига лейкоцитов (ИСЛ), который рассчитывается как отношение числа гранулоцитов к сегментоядерным нейтрофилам. ИСЛ у здоровых осетров – 0,25–0,40; у карпов – 0,30.

Пример изучения клеток крови рыб. В процессе изучения мазков крови были получены нижеописанные данные. У рыб основным отличием эритроцитов в сравнении с млекопитающими является наличие ядра (у млекопитающих зрелые эритроциты не имеют ядра). В окрашенных мазках крови эритроциты имеют синюю окраску и овальную форму. Ядро эритроцитов окрашивается ярче, чем цитоплазма (рис. 9.16).

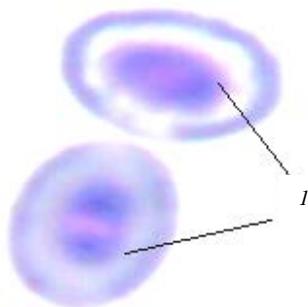


Рис. 9.16. Эритроциты радужной форели (1)

Клетки лейкоцитов у рыб в основном представлены гранулоцитами, лимфоцитами, моноцитами.

Гранулоциты. Эти клетки имеют характерную структуру, и их иногда называют полиморфно-ядерными лейкоцитами (PMN). В цитоплазме их содержатся многочисленные мелкие гранулы. Гранулоциты относятся к различным подгруппам клеток в зависимости от их окраски в мазках крови. У рыб гранулоциты делятся на три типа: нейтрофилы и эозинофилы являются наиболее распространенными, в то время как базофилы встречаются гораздо реже. Считается, что базофильные гранулоциты отсутствуют у лососевых.

Гранулоциты могут составлять 4–60 % лейкоцитов у рыб, и существует значительная разница в численности гранулоцитов, присутствующих в крови различных видов рыб.

Основным идентификационным признаком гранулоцитов является ядро, смещенное к краю цитоплазмы и занимающее значительное пространство. Также для гранулоцитов характерно наличие в ядре и цитоплазме включений – гранул (рис. 9.17).

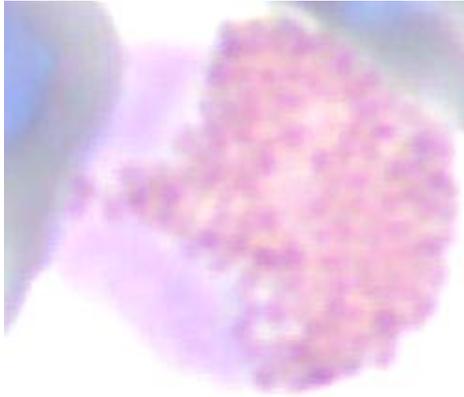


Рис. 9.17. Гранулоцит

Лимфоциты. Это большие округлые клетки, ядро занимает почти всю цитоплазму. Зрелые лимфоциты окрашиваются в синий цвет, незрелые – в фиолетовый (рис. 9.18). Среди белых клеток крови составляют большинство, образуя лимфоцитарный профиль.

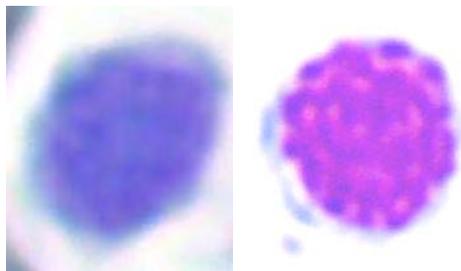


Рис. 9.18. Зрелый (слева) и незрелый (справа) лимфоциты

Моноциты. Представляют собой крупные клетки с большим ядром, занимающим от одной трети до половины клетки. Основными идентификационными признаками являются наличие в цитоплазматической мембране выступов и овальная форма клетки (рис. 9.19).



Рис. 9.19. Моноцит

Тромбоциты. По морфологической форме различают тромбоциты:

- овальный (рис. 9.20, а);
- веретенообразный (рис. 9.20, б);
- с шипами (рис. 9.20, в);
- фрагментированный (рис. 9.20, г).

Овальная или веретенообразная формы клеток – нормальные формы тромбоцитов в естественных условиях. В связи с этим тромбоциты легко спутать с лимфоцитами.

Основным гематологическим показателем является формула крови, которая отражает процентное и количественное соотношение различных клеток крови (табл. 9.1). Лейкоцитарная формула отражает процентный состав клеток белой крови.

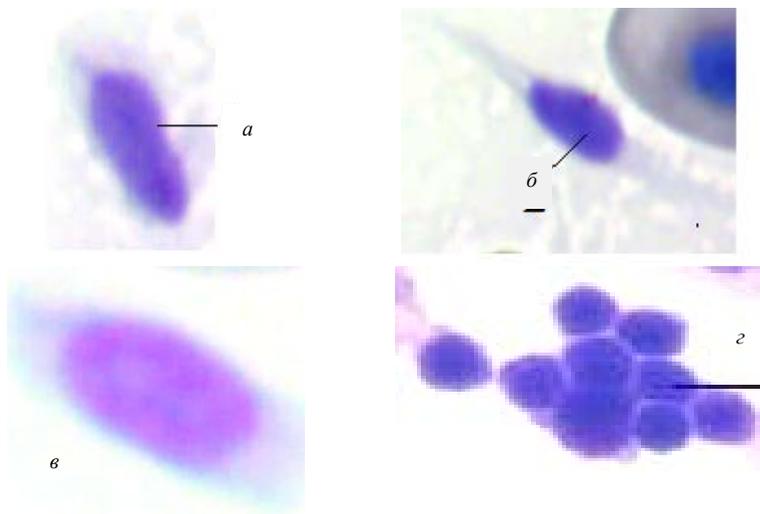


Рис. 9.20. Тромбоциты: *а* – овальный; *б* – веретенообразный; *в* – с шипами; *г* – фрагментированный

Таблица 9.1. Формулы крови радужной форели средней массой 50 г

Номер мазка	Форменные элементы						Итого
	Эритроциты, %	Незрелые лимфоциты, %	Зрелые лимфоциты, %	Моноциты, %	Гранулоциты, %	Тромбоциты, %	
1	86,60	1,30	6,80	0,20	0,80	4,20	100
2	93,00	0,70	2,60	0,30	0,40	3,00	100
3	91,10	0,60	3,40	0,40	0,50	3,90	100
4	92,60	1,60	3,40	0,40	0,90	1,10	100
5	93,50	0,80	1,90	0,90	0,90	2,00	100
6	93,70	0,90	3,10	0,80	1,30	1,20	100
7	90,00	0,20	6,00	0,50	1,60	1,70	100
8	91,40	0,50	5,30	0,30	0,80	1,50	100
9	85,50	0,60	4,30	0,70	0,70	1,90	100
10	90,40	0,20	5,60	0,60	0,50	2,70	100
Среднее значение	90,78	0,74	4,24	0,47	0,84	2,32	100

9.4.2. Результаты биохимических исследований разных видов рыб

Результаты биохимических исследований хищных и растительноядных рыб (РЯР) представлены в табл. 9.2–9.13.

Таблица 9.2. Активность ферментов сыворотки крови молоди радужной форели

Вид рыбы	Показатель					
	СК, Ед/л	HBDH, Ед/л	ALT, Ед/л	LDH, Ед/л	AST, Ед/л	ALP, Ед/л
Радужная форель	3277,6	686,7	11,8	2215,0	256,1	110,4

Примечание. СК – креатинкиназа; HBDH – гидроксibuтиратдегидрогеназа; ALT – аланинаминотрансфераза; AST – аспаратаминотрансфераза; LDH – лактатдегидрогеназа; ALP – щелочная фосфатаза.

Таблица 9.3. Концентрации основных параметров сыворотки крови молоди радужной форели

Вид рыбы	Показатель								
	Chol, ммоль/л	P, ммоль/л	Glukoza, ммоль/л	Ca, ммоль/л	TG, ммоль/л	Alb, г/л	Mg, ммоль/л	UREA, мкмоль/л	TP, г/л
Радужная форель	10,31	1,10	3,00	2,20	8,82	3,70	0,22	220,70	5,40

Примечание. Chol – холестерин; P – фосфор; Glukoza – глюкоза; Ca – кальций; TG – триглицериды; Alb – альбумин; Mg – магний; UREA – мочеви́на; TP – общий белок.

Таблица 9.4. Гематологические показатели карпа (физиологическая норма)

Показатели	Карп		
	Сеголетки (пруды, экстенсивная технология)	Сеголетки (садки)	Сеголетки (бассейн)
1	2	3	4
Гемоглобин, г/л	85,1 ± 2,3	89,0 ± 2,4	75,4 ± 4,3
Гематокрит, %	39,9 ± 1,1	35,4 ± 0,3	34,1 ± 1,0
Эритроциты, млн/мкл	1,5 ± 0,004	1,09 ± 0,4	1,3 ± 0,2
Ср. объем эритроцитов, мкм ³	268,7 ± 10,6	24,7 ± 2,7	349,6 ± 7,3

1	2	3	4
Содержание гемоглобина в эритроцитах, пг	56,7 ± 2,7	81,6 ± 2,3	58,0 ± 4,0
Лейкоциты, тыс/мкл	24,5 ± 4,3	41,0 ± 4,5	39,4 ± 4,3
Бласты, %	0,6 ± 0,4	0,3 ± 0,1	1,1 ± 0,2
Промиелоциты, %	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,01	0,6 ± 0,2
Миелоциты нейтрофильные, %	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1
Метамиелоциты нейтрофильные, %	0,4 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,2
Палочкоядерные нейтрофилы, %	0,4 ± 0,2	1,0 ± 0,3	0,8 ± 0,2
Сегментоядерные нейтрофилы, %	0,3 ± 0,1	1,0 ± 0,5	1,0 ± 0,3
Общее число нейтрофилов, %	1,6 ± 0,2	3,2 ± 1,0	2,8 ± 0,7
Эозинофилы и псевдоэозинофилы, %	3,7 ± 1,2	0,0	0,0
Базофилы и псевдобазофилы, %	3,6 ± 0,8	0,0	1,0 ± 0,5
Пенистые клетки, %	0,7 ± 0,3	1,9 ± 0,4	1,6 ± 0,4
Моноциты, %	4,2 ± 0,5	3,0 ± 0,5	2,7 ± 0,7
Лимфоциты, %	85,6 ± 1,6	91,5 ± 0,9	90,2 ± 1,4
Содержание общего белка в сыворотке крови, г%	2,5–3,0	–	–

Таблица 9.5. Гематологические показатели РЯР (физиологическая норма)

Показатели	Пестрый толстолобик		Белый толстолобик		
	Сеголетки (лето)	Сеголетки (зима)	Годовики	Двухлетки	Сеголетки (лето)
1	2	3	4	5	6
Гемоглобин, г/л	74,9 ± 2,2	96,9 ± 2,8	65,8 ± 3,8	85,8 ± 2,4	80,9 ± 1,4
Гематокрит, %	37,8 ± 0,7	40,7 ± 2,9	28,6 ± 1,3	40,2 ± 1,7	51,4 ± 1,3
Эритроциты, млн/мкл	1,9 ± 0,05	1,8 ± 0,07	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,08	1,9 ± 0,04
Ср. объем эритроцитов, мкм ³	204,4 ± 12,9	247,08 ± 28,5	195,6 ± 8,4	243,1 ± 14,3	266,4 ± 6,2
Содержание гемоглобина в эритроцитах, пг	40,67 ± 3,4	55,2 ± 3,9	44,98 ± 1,5	51,38 ± 3,2	41,6 ± 0,9
Лейкоциты, тыс/мкл	26,2 ± 4,6	10,6 ± 1,8	34,6 ± 2,7	39,8 ± 3,7	56,8 ± 4,0
Тромбоциты, тыс/мкл	29,95 ± 3,6	11,5 ± 1,95	21,1 ± 2,5	34,3 ± 1,4	63,6 ± 8,1

Окончание табл. 9.5

1	2	3	4	5	6
Бласты, %	0,0	0,1	0,0	0,0	1,2 ± 0,3
Промиеоциты, %	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,1	0,0	1,1 ± 0,2
Миелоциты нейтрофильные, %	0,4 ± 0,1	2,5 ± 0,2	1,3 ± 0,3	0,0	0,9 ± 0,2
Метамиеоциты нейтрофильные, %	1,3 ± 0,3	22,9 ± 2,7	18,4 ± 2,6	2,9 ± 0,4	0,7 ± 0,2
Палочкоядерные нейтрофилы, %	0,2 ± 0,1	7,7 ± 1,0	8,8 ± 1,1	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,3
Сегментоядерные нейтрофилы, %	0,0	2,7 ± 0,6	2,1 ± 0,5	0,0	0,0
Общее число нейтрофилов, %	2,5 ± 0,3	35,8 ± 2,7	30,6 ± 2,6	3,5 ± 0,4	2,4 ± 0,3
Эозинофилы и псевдоэозинофилы, %	9,7 ± 1,1	1,5 ± 0,3	0,1 ± 0,3	6,9 ± 0,6	4,2 ± 0,6
Базофилы и псевдобазофилы, %	0,4 ± 0,1	0,0	0,0	0,0	0,1
Пенистые клетки, %	0,0	0,0	0,1	0,5 ± 0,1	0,2
Моноциты, %	0,2 ± 0,1	1,3 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0	0,9 ± 0,2
Лимфоциты, %	67,1 ± 1,4	60,6 ± 3,3	68,5 ± 4,1	88,9 ± 0,7	90,1 ± 0,8
Содержание общего белка в сыворотке крови, г%	–	1,7–3,0	–	4,41 ± 0,2	–

Таблица 9.6. Биохимическая характеристика годовиков ленского осетра

Показатель	Значения
Общий белок, г/л	17,8 ± 1,7–32,7 ± 2,8
Мочевина, ммоль/л	1,35 ± 0,31–0,87 ± 0,08
Глюкоза, ммоль/л	1,67 ± 0,21–2,03 ± 0,38
Холестерин, ммоль/л	5,0 ± 1,4–5,33 ± 1,4
Щелочная фосфатаза, Ед/л	205,0 ± 52,3–230,0 ± 57,5

Таблица 9.7. Биохимическая характеристика личинок белуги

Показатель	Значения
AST, ME/л ⁻¹	243,1 ± 66,71–315,08 ± 29,8
ALP, ME/л ⁻¹	915,12 ± 51,61–1017,26 ± 98,62
ALT, ME/л ⁻¹	5,63 ± 0,82–5,92 ± 0,81
LDH, ME/л ⁻¹	1010,11 ± 64,36–1079,35 ± 101,5
GLU (глюкоза), ME/л ⁻¹	97,93 ± 2,14–100,20 ± 0,87

Таблица 9.8. Биохимическая характеристика сыворотки крови зрелых производителей севрюги

Группа	ALP	ACP	LDH	CK	AST	ALT
Самцы	72,50 ± 10,44	15,81 ± 2,49	2053,30 ± 568,08	5958,94 ± 1330,54	244,9 ± 46,33	5,41 ± 1,18
Самки	65,60 ± 14,65	15,46 ± 2,74	1961,00 ± 481,71	7233,15 ± 2021,40	286,30 ± 59,29	5,89 ± 1,18
Р-критерий	0,095	0,671	0,583	0,028	0,019	0,213
Общий объем выборки	69,05 ± 13,04	15,63 ± 2,59	2007,15 ± 521,97	6596,05 ± 1807,19	265,60 ± 56,55	5,65 ± 1,18

Таблица 9.9. Биохимические показатели сыворотки крови производителей осетровых в преднерестовый период

Показатель	Диапазон нормальных значений	Стерлядь (n = 8)	Бестер F ₁ (n = 3)
Глюкоза, ммоль/л	1,7–2,1	4,2 ± 1,0	5,4 ± 2,5
Общий белок, г/л	30–45	41,9 ± 2,2	46,7 ± 5,8
АсАТ, мккат/л	–	1,02 ± 0,04	0,86 ± 0,32
АлАТ, мккат/л	–	0,39 ± 0,03	0,25 ± 0,04
Коэффициент де Ритиса	2,0–4,0	2,6	3,4
Неорганический фосфор, ммоль/л	2,0–3,0	2,8 ± 0,3	2,3 ± 0,2
Общий кальций, ммоль/л	1,8–2,3	2,5 ± 0,2	1,8 ± 0,3

Таблица 9.10. Морфофизиологические показатели цельной крови производителей осетровых рыб в преднерестовый период

Показатели	Диапазон нормальных значений	Стерлядь (n = 8)	Бестер F ₁ (n = 3)
HGB, г/л	67–110	87,3 ± 6,3	82,5 ± 5,1
RBC, ×10 ¹²	0,9–1,9	1,91 ± 0,17	1,86 ± 0,40
PCV, %	26–46	26,7 ± 1,7	27,8 ± 1,6
MCHC, г/л	250–350	331,9 ± 23,6	297,8 ± 21,7
MCH, пг	40–110	47,4 ± 4,2	50,4 ± 14,2
MCV, мкм ³	140–300	145,7 ± 14,6	164,5 ± 34,5

Таблица 9.11. Морфологический состав крови годовиков гибрида С × БС

Показатель	Контроль
HGB, г/л	89,0 ± 6,0
PCV, %	29,2 ± 1,2
RBC, ×10 ¹²	1,6 ± 0,1
MCHC, г/л	309,7 ± 32,4
MCV, мкм ³	188,4 ± 13,2
MCH, пг	57,7 ± 5,7

Таблица 9.12. Концентрация половых гормонов в сыворотке крови производителей осетровых в преднерестовый период

Показатели	Стерлядь ($n = 15$)	Бестер F ₁ ($n = 8$)
Прогестерон, нг/л	$9,6 \pm 6,0$	$2,9 \pm 1,7$
Эстрадиол, пг/мл	$454,6 \pm 82,9$	$86,4 \pm 27,3$
Тестостерон, нг/мл	$4,5 \pm 2,2$	$9,7 \pm 1,6$

Таблица 9.13. Концентрация половых гормонов в сыворотке крови годовиков гибрида С × БС

Показатель	Контроль	Опыт
Прогестерон, нг/мл	$1,0 \pm 0,4$	$11,4 \pm 7,2$
Эстрадиол, пг/мл	$64,6 \pm 38,3$	$197,2 \pm 51,9$
Тестостерон, нг/мл	$1,52 \pm 0,6$	$10,2 \pm 1,2$

10. МЕТОДЫ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ. БИОТЕСТИРОВАНИЕ

Биотестирование устанавливает подходы к определению острой токсичности химических веществ и их смесей, природных и сточных вод в лабораторных условиях с использованием в качестве тест-объектов аквариумных рыб гуппи (*Poecilia reticulata*).

Область применения: оценка острой токсичности водорастворимых химических веществ, их смесей, природных и сточных вод, установление нормативных требований к качеству вод, контроль за соблюдением нормативов допустимых сбросов химических веществ в водные объекты в комплексе с физико-химическими методами; мониторинг водных объектов, прежде всего в районах расположения источников антропогенного воздействия; оценка состояния водных экосистем.

Термины и определения:

- безвредная концентрация отдельных веществ (БК10) или кратность разбавления вод (БКР10) – экспериментально полученное значение концентрации химического вещества в воде или кратности разбавления вод, соответственно вызывающей изменение тест-реакции не более чем у 10 % особей тестируемой популяции при краткосрочном воздействии в течение заданного срока наблюдений;
- биологическое тестирование воды (раствора химического вещества) – экспериментальное определение токсичности воды (раствора химического вещества) по изменению определенного показателя жизнедеятельности тест-объекта;
- вещество – химический элемент и его соединения, находящиеся в естественном состоянии либо полученные в результате антропогенной деятельности, за исключением растворителя;
- воспроизводимость результатов биотестирования – характеристика качества биотестирования, отражающая близость результатов, полученных по одной методике, на одном и том же эталонном веществе, но в различных условиях (разными операторами, в разных лабораториях или в разное время);
- исходный раствор – концентрированный водный раствор исследуемого вещества, из которого готовят растворы с разными концентрациями этого вещества для последующего тестирования;
- критерий токсичности – установленное значение изменения выбранного показателя жизнедеятельности тест-объекта, на основании которого делают вывод о токсичности тестируемого объекта;

- медианная эффективная концентрация или кратность разбавления вод (ЭК50/ЭКР50) – экспериментально полученное значение концентрации химического вещества (смеси) в воде или кратности разбавления вод, вызывающей изменение тест-реакции у 50 % особей тестируемой популяции при краткосрочном воздействии в течение заданного срока наблюдения;

- медианная летальная концентрация или кратность разбавления вод (ЛК50/ЛКР50) – экспериментально полученное значение концентрации химического вещества (смеси) в воде или кратности разбавления вод, вызывающей гибель 50 % особей тестируемой популяции при краткосрочном воздействии в течение заданного срока наблюдений;

- острая токсичность – присущее химическому веществу (смеси) свойство наносить ущерб организму при краткосрочном воздействии на него;

- полустатическая (статически возобновляемая) тест-система – статическая система, в которой тестируемый раствор обновляется каждые 24 ч;

- предельно допустимый сброс – масса химического вещества в сточных водах, максимально допустимая к отведению с установленным режимом в данном пункте водного объекта в единицу времени с целью обеспечения норм качества воды в контрольном пункте;

- проточная тест-система – тест-система, при которой происходит непрерывный или периодический пассаж тестируемого раствора без рециркуляции через емкость, в которой проводится эксперимент или культивирование тест-организма;

- смесь – два или более вещества в твердом виде или находящиеся в растворенном состоянии при условии, что они не вступают в реакции друг с другом;

- сточная вода – вода, отводимая после использования ее в хозяйственно-бытовой и производственной деятельности (кроме дренажной, карьерной, шахтной, рудничной), а также отводимая с застроенной территории, на которой она образовалась;

- статическая тест-система – тест-система, при которой тестируемый раствор не возобновляется в ходе эксперимента;

- тест-объект(ы) – водный(ые) организм(ы), чувствительный(е) к действию токсических веществ и специально подготовленный(е) в лабораторных условиях к биотестированию;

- тест-реакция – изменение выбранного показателя жизнедеятельности тест-объекта под воздействием токсического вещества;
- токсичность – свойство воды (водной вытяжки, раствора химического вещества), обусловленное наличием в ней токсических веществ и характеризующее ее способность нарушать жизнедеятельность водных организмов;
- токсический эффект – результат воздействия токсиканта на водный организм, проявляющийся в изменении показателей его жизнедеятельности;
- уровень токсичности воды (раствора химического вещества) – количественная характеристика токсичности, определяемая через минимальную кратность разбавления, при котором токсичность воды уже не проявляется.

10.1. Условия выполнения биотестирования

Биотестирование проводится в нормальных лабораторных условиях, в помещении, где не хранятся летучие вещества и не выполняются работы с их применением. До эксперимента и в ходе его лабораторные помещения не обрабатывают инсектицидами.

Температура воздуха в лаборатории при биотестировании должна быть 21–25 °С (для каждой методики установлены свои температурные оптимумы), но для каждого отдельного теста – быть постоянной в пределах ± 1 °С.

Освещение помещения: естественное или искусственное. Используют рассеянный свет, не допускается попадание прямых солнечных лучей на тест-объект.

Световой период: желательно проводить тест с чередованием циклов света и темноты 16 ч:8 ч либо 12 ч:12 ч с 15–30-минутным переходным периодом. Для поддержания светового режима рекомендуется использовать термолюминистат.

Оборудование, контактирующее с тестируемыми растворами, должно быть сделано предпочтительно полностью из стекла или других инертных материалов.

10.2. Общие принципы и схема проведения биотестирования

Принципиальная схема проведения биотестирования включает три основных этапа:

1) подготовка к тестированию: сбор имеющейся доступной информации о химическом веществе, предполагаемом составе сточных вод; анализ собранной информации и разработка схемы исследования; культивирование тест-культуры; приготовление растворов тестируемых веществ заданных концентраций, отбор проб анализируемых образцов окружающей среды (поверхностных вод, сточных вод, отходов и т. д.) и приготовление вытяжек;

2) непосредственно эксперимент, проводимый в две фазы: тест на установление границ исследования и окончательный тест. При необходимости дополнительно проводят ограничительный тест;

3) обработка и оценка полученных результатов.

1-й этап. Подготовка к тестированию.

Необходимо собрать следующую информацию о веществе: растворимость в воде, давление насыщенного пара, химическая устойчивость, константы диссоциации, биоразлагаемость. Дополнительные данные, которые следует принимать во внимание при планировании эксперимента и интерпретации полученных результатов: структурная формула, степень чистоты, происхождение и процентное содержание значимых примесей, присутствие добавок и их количество, коэффициент распределения *n*-октанол/вода.

На основании анализа собранной информации разрабатывается схема исследования. Она включает:

- выбор тест-системы (статической, полустатической, проточной) в зависимости от стойкости вещества;
- выбор вспомогательных веществ для тестирования веществ с низкой водорастворимостью: органический растворитель, эмульгатор или дисперсант; допускается использование метода ультразвуковой дисперсии. Рекомендуемые органические растворители: триэтиленгликоль, диметилформамид, этанол, ацетон;
- выбор наиболее соответствующего цели исследования тест-объекта (при наличии информации о чувствительности того или иного вида к отдельным классам веществ).

Культивирование тест-культур проводят в соответствии с требованиями, изложенными в конкретных методиках.

С периодичностью, определенной каждой конкретной методикой, но не реже 1 раза в полгода тест-культуры проверяют на пригодность к биотестированию путем оценки чувствительности к эталонному (референсному) веществу – двуххромовокислороду калию ($K_2Cr_2O_7$). Тест-объекты должны реагировать на воздействие эталонного агента в оговоренном методикой диапазоне.

Удовлетворительные результаты, полученные при проверке диапазона реагирования тест-организмов на модельный токсикант, не обеспечивают гарантии адекватного реагирования организмов на другие вещества и их смеси, однако регулярно проводимая проверка позволяет выявить ошибки при приготовлении исследуемых смесей и растворов, а также нарушения, допускаемые в процессе культивирования организмов и условиях проведения опытов.

Если чувствительность культуры не удовлетворяет установленным требованиям, анализируют возможные причины снижения чувствительности, проводят соответствующую корректировку условий культивирования. При необходимости культуру заменяют новой.

В течение 1 мес до и в период постановки эксперимента у тест-объектов не должно наблюдаться признаков стресса: высокой смертности, аномального поведения животных.

Для исключения периода акклиматизации культуры перед биотестированием рекомендуется, чтобы вода, в которой культивируется тест-организм, имела сходный состав (рН, жесткость) с используемой в качестве разбавляющей для теста. В противном случае культуру адаптируют к тестовым условиям (температура, вода того же состава, что и используемая в тесте разбавляющая вода) в течение не менее 48 ч.

Отбор проб поверхностных вод осуществляют согласно ГОСТ 17.1.5.05-85 «Общие требования к отбору проб поверхностных и морских вод, льда и атмосферных осадков», сточных вод – согласно Инструкции по отбору проб для анализа сточных и поверхностных вод, утвержденной Госкомитетом Республики Беларусь по экологии 16 февраля 1994 г.

Для отбора и хранения проб используют стеклянную посуду, которую заполняют под пробку и плотно закрывают. Объем пробы воды для определения острой токсичности должен быть в два раза больше требуемого для хранения дубликата пробы до конца тестирования. Пробы, отобранные для биотестирования, не подлежат консервированию химическими веществами и замораживанию.

Биотестирование проб воды проводят не позднее 6 ч после отбора, а при отсутствии такой возможности допускается биотестирование проб воды, которые хранились в темноте в доверху наполненной плотно закрытой посуде при температуре $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$ не более 72 ч.

Перед биотестированием пробы воды перемешивают и фильтруют через фильтровальную бумагу. Если того требует цель биотестирования, пробы воды не фильтруют.

Приготовление растворов тестируемых химических веществ, их смесей, природных и сточных вод заданных концентраций.

Для выполнения биотестирования готовят серию (не менее 5) растворов, содержащих исследуемое вещество (смесь веществ) в разных концентрациях, или серию (не менее 5) разбавлений тестируемой пробы воды (сточной, природной).

Выбранные тестовые концентрации сточных, природных вод, вытяжек готовятся разведением исходных сточных, природных вод, вытяжек до требуемой концентрации по отношению к исходной.

Выбранные тестовые концентрации химического вещества (смеси веществ) готовятся разведением исходного (маточного) раствора тестируемого вещества (смеси веществ). Если тестируются высокие концентрации, вещество может быть растворено в разбавляющей воде непосредственно.

Химические соединения должны тестироваться до предела растворимости в воде. Для веществ, имеющих низкую растворимость в воде, допустимо использовать для тестирования насыщенный раствор, чтобы была достигнута максимально возможная концентрация. Важно чтобы эта концентрация не нарушала тест-систему иным образом (например, образование пленки на поверхности раствора предотвращает насыщение воды кислородом).

Если используется вспомогательное вещество, все тестируемые растворы должны содержать его в равных количествах. Концентрации данных веществ должны быть минимальными, но в любом случае не превышать 100 мг/дм³.

Обязателен контроль концентрации веществ и их смесей после приготовления тестируемых растворов. Если это невозможно – используют номинальные концентрации.

В дополнение к серии разведений тестируемого вещества обязательна параллельная постановка контроля (разбавляющая вода без вещества). Если в ходе эксперимента применяются вспомогательные вещества, необходим дополнительный контроль (разбавляющая вода, содержащая растворитель в максимально используемой концентрации).

В качестве разбавляющей воды может использоваться бутилированная питьевая, водопроводная (дехлорированная и насыщенная кислородом путем отстаивания в течение не менее 3 сут) либо восстановленная вода (готовят в соответствии с ИСО 6341. Рекомендуемыми параметрами качества воды, используемой в этих целях, являются: жесткость (по CaCO₃) – не более 180 мг/дм³,

химическая потребность в кислороде – не более 5 мг/дм³, содержание взвешенных частиц – не более 20 мг/дм³, остаточного хлора – не более 3 мкг/м³, общих фосфорорганических пестицидов – не более 50 нг/дм³, органического хлора – не более 25 нг/дм³, органических веществ в пересчете на углерод – не более 2 мг/дм³.

Растворы тестовых концентраций должны готовиться непосредственно перед внесением тест-организмов. Эксперимент должен начаться не позднее чем через 30 мин с момента приготовления растворов.

Рекомендуется контроль концентрации тестируемых веществ и их смесей в начале и конце теста действующими методами определения содержания химических веществ в воде (титриметрический, газохроматографический и др.).

2-й этап. Проведение эксперимента.

В ходе эксперимента тест-объекты в течение определенного методикой промежутка времени подвергаются воздействию растворенного в воде вещества (смеси веществ, вод, вытяжек из объектов окружающей среды) в диапазоне концентраций.

Повторность в опыте и контроле трехкратная (в ориентировочном эксперименте допускается одно- или двукратная).

Температура определяется методикой, но для каждого отдельного теста должна быть постоянной в пределах ± 1 °С.

В контроле и тестовых растворах рН должен измеряться в начале и конце теста. Тест должен выполняться без корректировки рН. Если есть доказательства заметных изменений рН, рекомендуется повторение теста после коррекции. Для этих целей предпочтительно использовать 0,1 н. растворы HCl и NaOH. Корректировка рН должна быть проведена таким образом, чтобы концентрация тестируемого вещества в исходном растворе значительно не менялась. Если данная процедура вызвала химические реакции или осаждение тестируемого вещества, это должно быть отражено в результатах теста.

Световой период: рекомендуется проводить тест с чередованием циклов света и темноты – 16:8 ч либо 12:12 ч с 15–30-минутным переходным периодом.

По окончании эксперимента в каждом сосуде определяют рН, содержание тестируемого вещества, а также концентрацию растворенного кислорода в экспериментальных сосудах, соответствующих самой низкой концентрации, вызывающей 100%-ный токсический эффект (при необходимости для этого соединяют содержимое сосудов,

соответствующих такой концентрации, в один сосуд, соблюдая необходимые требования предосторожности, чтобы не изменить концентрацию растворенного кислорода).

Ориентировочный тест на установление границ исследования (1-й этап биотестирования). Проводится с целью установления диапазона концентраций для окончательного тестирования. При этом тест-объекты экспонируют концентрациями в широком диапазоне, например с разницей в порядок 1, 10, 100 мг/дм³. Экспозиция может быть укорочена, если данные получены за более короткий период времени.

Окончательный тест (2-й этап биотестирования). Заключается в экспонировании тест-объектов пятью и более концентрациями в установленном диапазоне реагирования тест-объекта на тестируемый субстрат, выбранном в геометрической прогрессии с отношением между ними от 1,5 до 2 (например, 2, 4, 8, 16, 32 и 64 мг/дм³). Цель – на основании полученных данных построить кривую зависимости «концентрация – ответ» и установить значения Э(Л)К50, Э(Л)К16 и Э(Л)К84, а также Э(Л)К0 (наибольшая из протестированных концентраций, не вызвавшая гибель (эффект) за период экспозиции) и Э(Л)К100 (наименьшая из протестированных концентраций, вызвавшая иммобилизацию 100 % за период экспозиции).

При тестировании сточных вод тест-объекты экспонируют сточными водами в концентрациях 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,5; 0,78 % от исходной концентрации. Если предварительно известно, что сточные воды обладают гипертоксичностью, концентрации снижают до 10; 3; 0,3; 0,1 %.

Контрольный (ограничительный) тест. Выполняют, если полученное значение Э(Л)К50 при тестировании химического вещества или смеси выше 100 мг/дм³. При этом тест-объекты экспонируют веществом в концентрации 100 мг/дм³ в течение полного периода экспозиции, чтобы показать, что Э(Л)К50 выше 100 мг/дм³. Если концентрация вещества 100 мг/дм³ в воде не может быть достигнута, ограничительный тест должен быть выполнен на концентрации, эквивалентной растворимости вещества (или максимальной концентрации, образующей устойчивую дисперсию) в используемом тестовом субстрате.

Результаты испытаний могут считаться достоверными, если были соблюдены следующие критерии качества:

- в течение теста концентрация тестируемого вещества должна поддерживаться в пределах 80 % от исходной. Для веществ, которые

легко растворяются в контрольной среде, образуя устойчивые растворы, за исходную концентрацию может быть принята эквивалентная номинальная концентрация. Для веществ, которые плохо растворимы в контрольной среде, способны образовывать устойчивые эмульсии и суспензии либо неустойчивы в водных растворах, за исходную концентрацию должна приниматься концентрация, измеренная в начале теста непосредственно в растворе (если это технически невозможно, то измеренная в водяном столбе). Концентрацию следует определять после установления равновесия, но до внесения тест-организмов.

- токсический эффект в контроле не превышает 10 %;
- значение pH варьируется не более чем на 1 ед.;
- содержание растворенного кислорода, рассчитанное в конце эксперимента, – не ниже 2 мг/дм³.

3-й этап. Обработка и оценка полученных результатов.

Способ обработки и оценки результатов биотестирования основан на стандарт-ных и широко используемых в отечественной и международной практике методах статистической обработки экспериментальных данных.

Вывод о наличии или отсутствии острой токсичности пробы воды, вещества (смеси веществ) делают на основании величин А (для водорослей) или Р (для рыб), алгоритм их расчета описан в соответствующих разделах каждой методики:

- если величина А (Р) $\leq 10\%$ – тестируемая проба не оказывает острого токсического действия (безвредная кратность разбавления);
- при А (Р) $\geq 50\%$ считается, что анализируемая проба проявляет острую токсичность.

Если проба проявляет острую токсичность, то для количественной оценки устанавливают ее среднее эффективное (летальное) разбавление за 72/96 ч биотестирования (Э(Л)КР50). Для количественной оценки токсичности вещества (смеси веществ) устанавливают медианную эффективную (летальную) концентрацию за полный период экспозиции (Э(Л)К50-96 или ЭК50-72) и ее доверительный интервал ($p = 0,05$), а также Э(Л)К16 и Э(Л)К84.

Значения Э(Л)К0 (наибольшая из протестированных концентраций, не вызвавшая эффект (гибель) через 72/96 ч) и Э(Л)К100 (наименьшая из протестированных концентраций, вызвавшая эффект (гибель) 100 % через 72/96 ч) определяют непосредственно из результатов эксперимента.

Рекомендуется установить Э(Л)К50 (Э(Л)КР50), Э(Л)К16 и Э(Л)К84 для каждого из периодов наблюдения – 24, 48, 72 и 96 ч.

Если экспериментально не удалось получить точные значения Э(Л)К50 (Э(Л)КР50), Э(Л)К16 и Э(Л)К84, то для получения данных значений без выполнения дополнительных экспериментов их определяют графическим способом. Также может быть использован метод пробит-анализа по Литчфилду – Вилкоксону.

Результат токсикологического анализа в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде

$$\text{Э(Л)К50} \pm S_x t,$$

где S_x – ошибка;

t – критерий Стьюдента.

Значения Э(Л)Кх должны быть выражены в процентах либо в кубических сантиметрах (кубических дециметрах) в случае использования сточных вод; в миллиграммах на кубический дециметр в случае тестирования химических веществ.

Интерпретация полученных токсикометрических данных для веществ и смесей должна производиться в соответствии с критериями, приведенными в Согласованной на глобальном уровне системе классификации и маркировки химических веществ (далее – СГС).

Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности проводят в объеме 5 % от количества текущих измерений по результатам двух определений токсичности анализируемой пробы воды, раствора вещества (смеси веществ), полученных в условиях воспроизводимости (Э(Л)КР1, Э(Л)КР2 или Э(Л)К1, Э(Л)К2).

Решение об удовлетворительности воспроизводимости определений принимается при условии

$$\frac{2|\text{Э(Л)К}_1 - \text{Э(Л)К}_2|}{\text{Э(Л)К}_1 + \text{Э(Л)К}_2} \cdot 100\% \leq D,$$

где D – норматив оперативного контроля воспроизводимости (его значение определено для каждой отдельно взятой методики).

10.3. Методика биотестирования с использованием тест-культуры рыб гуппи (*Poecilia reticulata*)

Принцип методики. Методика биотестирования с использованием тест-культуры рыб гуппи (*Poecilia reticulata*) основана на установлении различия между количеством погибших рыб в анализируемой пробе (опыт) и культуральной среде (контроль). Критерием острой токсичности является гибель 50 % рыб и более в опыте по сравнению с контролем за 96 ч биотестирования при условии, что в контрольном эксперименте гибель не превышает 10 %.

Для количественной оценки токсичности пробы раствора устанавливают медианную летальную концентрацию за 96 ч (ЛК50-96).

Дополнительно к *Poecilia reticulata* без изменений методики можно использовать следующие виды рыб: *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae), *Lepomis macrochirus* (Teleostei, Centrarchiae), *Oryzias latipes* (Teleostei, Poeciliidae), *Pimephales promelas* (Teleostei, Cyprinidae). Метод может быть использован для других видов пресноводных, морских или соленоводных рыб с соответствующими изменениями, например, качества разбавляющей воды и температурных условий испытания.

Тест-объект: культура гуппи (*Poecilia reticulata*) Peters в возрасте не старше 2 сут (от 24 до 48 ч).

Процедура биотестирования. Тестирование проводят в стеклянных емкостях. В каждый из опытных и контрольных сосудов помещают по 10 (при ориентировочном тесте допускается 6) экземпляров гуппи в возрасте от 24 до 48 ч. Плотность посадки гуппи должна быть не более 10 экз. рыб на 5 дм³. Животных вносят не позднее 30 мин с момента приготовления разведений.

Повторность в опыте и контроле трехкратная.

За 1 сут и во время биотестирования рыб не кормят.

Температура анализируемой пробы должна поддерживаться в диапазоне от 21 до 25 °С.

Продолжительность биотестирования: 96 ч.

Учет результатов эксперимента: через 2 и 4 ч, а также через 24, 48 и 96 ч после начала тестирования. Погибших мальков удаляют из сосудов после регистрации наблюдений.

Погибшими считают особей, которые не подают признаков движения или дыхания при прикосновении к ним стеклянной палочкой.

Статистическая обработка данных. На основании результатов трех параллельных определений количества живых рыб в контроле и опыте находят среднее арифметическое по формуле

$$\bar{X}_{k(on)} = \frac{\sum_{i=1}^I X_{k(on)i}}{I},$$

где $\bar{X}_{k(on)}$ – результат i -го подсчета количества живых рыб в контроле (опыте);

I – число параллельных определений количества живых рыб в контроле (опыте), $I = 3$;

i – номер подсчета количества живых рыб в контроле (опыте).

Рассчитывают количество погибших рыб в опыте по отношению к контролю (в %) по формуле

$$A = \frac{\bar{X}_k - \bar{X}_{on}}{\bar{X}_k} \cdot 100.$$

Если величина A составляет 50 % и более, считают, что анализируемая проба проявляет острую летальную токсичность.

Для количественной оценки токсичности раствора вещества (смеси веществ) устанавливают ЛК50 вещества (смеси веществ) за 96 ч биотестирования (ЛК50-96) и ее доверительный интервал ($p = 0,05$), а также ЛК16 и ЛК84.

Норматив оперативного контроля воспроизводимости методики составляет 52 %.

10.4. Методика приготовления восстановленной воды

Восстановленную воду готовят в соответствии с требованиями, изложенными в ИСО 6341 (ниже приведен один из вариантов).

Восстановленную воду получают из четырех исходных растворов: хлористого кальция, сульфата магния, бикарбоната натрия и хлористого калия, полученных на основе дистиллированной или деионизированной воды. Все реактивы должны быть аналитической степени чистоты.

1. Раствор хлористого кальция получают растворением 11,76 г дигидрата хлористого кальция ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) в воде с доведением до 1 дм³.

2. Раствор сульфата магния получают растворением 4,93 г гептагидрата сульфата магния ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) в воде с доведением до 1 л.

3. Раствор бикарбоната натрия получают растворением 2,59 г бикарбоната натрия ($NaHCO_3$) в воде с доведением до 1 dm^3 .

4. Раствор хлористого калия получают растворением 0,23 г хлористого калия (KCl) в воде с доведением до 1 dm^3 .

Смешивают по 25 мл каждого из четырех растворов и доводят общий объем дистиллированной или деионизированной водой до 1 dm^3 . Приготовленная таким образом восстановленная вода отстаивается 12 ч, насыщается кислородом до равновесного состояния с окружающей средой и не нуждается в дальнейшей аэрации. Сумма ионов Ca и Mg в этом растворе составляет 2,5 ммоль/ dm^3 , соотношение ионов Ca:Mg – 4:1 и Na:K – 10:1, общая щелочность – 0,8 ммоль/ dm^3 ; рН полученной воды должен быть в пределах $7,8 \pm 0,2$. При необходимости возможна корректировка рН раствором гидроксида натрия или соляной кислотой.

10.5. Графический способ установления медианной эффективной (летальной) концентрации токсического вещества (смеси веществ) и среднего эффективного (летального) разбавления воды

Графический способ определения эффективных (ЭКх) и летальных (ЛКх) концентраций, в том числе ЭК50 (ЛК50), предполагает расчет их методом пробит-анализа с использованием программы Excel. При расчете необходимо придерживаться следующего алгоритма.

1. На основании полученных в эксперименте результатов заполняют графы 1, 2 и 3 табл. 10.1.

Таблица 10.1. Образец шапки таблицы для заполнения результатов эксперимента

Концентрация вещества (С), мг/ dm^3 , либо концентрация сточных вод, %	Десятичный логарифм концентрации ($\lg K$)	Токсический эффект (гибель, снижение скорости роста), %	Токсический эффект (гибель, снижение скорости роста), пробиты
1	2	3	4

2. Используя табл. 10.2 для экспериментально установленной доли гибели животных (снижения роста клеток водорослей), находят значения пробитов и заполняют графу 4.

3. В программе Excel строят точечный график, где по оси абсцисс откладывают десятичные логарифмы концентраций, а по оси ординат – соответствующий им эффект в пробитах.

4. Добавляют линейную линию тренда с выдачей уравнения регрессии.

5. Из уравнения регрессии вычисляют значения x , соответствующие $y = 3,72$ (10 % эффекта) и $y = 5$ (50 % эффекта).

Учитывая, что $x = \lg K$, логарифмы концентраций переводят в концентрации и получают их значения, соответствующие 10- и 50%-ному эффекту – БКР10, Э(Л)КР50, Э(Л)К50. Затем определяют доверительный интервал ($p = 0,05$).

Таким же образом рассчитывают значения ЭК16 и ЭК84 (4 и 6 пробитов).

Таблица 10.2. Образец заполнения таблицы перевода процентов в пробиты, % эффекта

Перевод процентов в пробиты, % эффекта	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	–	2,67	2,95	3,12	3,25	3,35	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,83	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,4	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33

Если наклон кривой «концентрация – ответ» слишком крутой для расчета ЭК50 (ЛК50), достаточно графического определения этой величины. Если две последовательные концентрации, выбранные в геометрической прогрессии, дают нулевой и 100%-ный эффект, эти две величины достаточны для определения диапазона, в который попадает Э(Л)К50.

1. Методика расчета ошибки (S_x):

$$S_x = \pm \frac{2\delta}{\sqrt{2N}},$$

где $2\delta = \text{Э(Л)К84} - \text{Э(Л)К16}$;

N – общее число животных, использованных для испытания доз, эффект которых лежит между 16 % (4 пробита) и 84 % (6 пробитов).

2. Определение доверительного интервала.

Доверительный интервал Э(Л)К50 находится в границах

$$\text{Э(Л)К50} \pm S_x t,$$

где S_x – ошибка;

t – критерий Стьюдента, равный 1,96.

10.6. Отчетность

Отчет о проведении теста должен, по возможности, включать информацию, приведенную в табл. 10.3.

Таблица 10.3. **Информация, которая должна включаться в отчет о проведении теста**

№ п/п	Данные
1	Информация о тестовых организмах: <ul style="list-style-type: none">• научное название, штамм, его источник;• методика культивирования, метод кормления (источник, вид, количество пищи, частота питания);• любые предварительные манипуляции со штаммом в период подготовки к тестированию
2	Все необходимые данные для идентификации проб или исследуемого вещества
3	3.1. Методы приготовления проб: <ul style="list-style-type: none">• для сточных вод – способ и длительность хранения проб, условия, при которых в случае необходимости осуществляется осветление или фильтрация проб и размораживание;• для химических веществ – метод приготовления основных и исследуемых растворов. 3.2. Вода, используемая для разведения: источник, важнейшие химические характеристики (рН, температура, жесткость). 3.3. Перечень использовавшихся концентраций и любая доступная информация о стабильности концентраций тестируемых веществ в тестовых растворах
4	Перечень оборудования, применяемого для проведения исследований
5	Использовавшиеся методы химического анализа, полученные результаты
6	Условия проведения биотестирования: световой режим, концентрация растворенного кислорода, значения рН и температур тестовых растворов
7	Результаты теста с эталонными веществами, если он проводился
8	Результаты контрольного теста (если он проводился)

№ п/п	Данные
9	9.1. Таблица, отражающая кумулятивную иммобилизацию животных для каждой концентрации, контроль, контроль со вспомогательными веществами (если используются) на каждый из рекомендуемых периодов наблюдения (24, 48, 96 ч) 9.2. Кривая «концентрация – эффект»
10	Результат эксперимента в виде: • Э(Л)К50 (Э(Л)КР50) для каждого из рекомендуемых периодов наблюдения (если возможно) и доверительный интервал; • Э(Л)К16 и Э(Л)К84 для каждого из рекомендуемых периодов наблюдения (если возможно); • БКР10 для каждого из рекомендуемых периодов наблюдения (если возможно) – для сточных и природных вод; По возможности: • наибольшая из протестированных концентраций Э(Л)К0, не вызвавшая иммобилизации через 96 ч; • наименьшая из протестированных концентраций Э(Л)К100, вызвавшая иммобилизацию 100 % через 96 ч. Статистические процедуры, использовавшиеся для определения значений параметров токсичности
11	Всякое anomальное поведение животных в условиях эксперимента. Любые отклонения от процедуры тестирования с указанием их причин, описание наблюдений, несвойственных обычному ходу эксперимента, представляющих интерес при интерпретации полученных результатов
12	Рекомендации

10.7. Категории острой токсичности согласно СГС

Согласованная на глобальном уровне система классификации и маркировки химических веществ (СГС) для веществ включает три категории острой токсичности. Критерии для отнесения вещества к одной из трех категорий острой токсичности определяются исключительно на основе данных для острой токсичности (Э(Л)К50) (табл. 10.4).

Таблица 10.4. Категории для веществ, опасных для водной среды.
Острая токсичность

Категория: ОСТРАЯ 1		
96 ч ЛК50 (для рыб)	≤ 1 мг/дм ³	и (или)
48 ч ЭК50 (для ракообразных)	≤ 1 мг/дм ³	и (или)
72 или 96 ч ЭК50 (для водорослей и других водных растений)	≤ 1 мг/дм ³	
Категория 1 может быть подразделена для использования в некоторых регулирующих системах, с тем чтобы включать нижний диапазон при Л(Э)К50 $\leq 0,1$ мг/дм ³		

Категория: ОСТРАЯ 2		
96 ч ЛК50 (для рыб)	$>1 - \leq 10$ мг/дм ³	и (или)
48 ч ЭК50 (для ракообразных)	$>1 - \leq 10$ мг/дм ³	и (или)
72 или 96 ч ЭК50 (для водорослей и других водных растений)	$>1 - \leq 10$ мг/дм ³	
Категория: ОСТРАЯ 3		
96 ч ЛК50 (для рыб)	$>10 - \leq 100$ мг/дм ³	и (или)
48 ч ЭК50 (для ракообразных)	$>10 - \leq 100$ мг/дм ³	и (или)
72 или 96 ч ЭК50 (для водорослей и других водных растений)	$>10 - \leq 100$ мг/дм ³	

Примечание. В некоторых регулирующих системах указанный диапазон может быть расширен за пределы Л(Э)К50 100 мг/дм³ путем введения еще одной категории.

10.8. Протокол содержания лабораторной культуры рыб гуппи (*Poecilia reticulata* Peters)

1. Характеристика вида.

Гуппи (*Poecilia reticulata* Peters) – широко распространенная аквариумная живородящая рыба. Половозрелые гуппи имеют хорошо развитые половые признаки, что облегчает их сортировку. Самцы, как правило, мельче (3–4 см) и имеют более яркую окраску, чем самки. У них преобладают серовато-коричневые тона с очень яркими красными, голубыми, зелеными и черными пятнами. Самки больше самцов (до 6 см в длину), чаще желтовато-зеленые. Анальный плавник у самок округлый. У молодых самцов он имеет ту же форму, однако со временем, в период полового созревания, начинает удлиняться и превращается в подвижный гоноподий. Выдерживает значительные колебания солености. Продолжительность жизни составляет 3–3,5 года.

2. Условия содержания.

Для содержания (культивирования) гуппи пригодны любые термостатируемые аквариумы, которые обеспечивают температуру воды (25 ± 1) °С и плотность посадки самцов из расчета 1–2 дм³ воды на 1 экз., самок – не менее 4 дм³.

Аквариум заполняют отстоянной и проаэрированной в течение 3 сут питьевой водопроводной водой с рН 8,0–8,5, температурой 21–25 °С. Содержание растворенного в воде кислорода должно быть не менее 4 мг/дм³. Аквариумы освещают верхним светом не менее 8 ч/сут. В качестве источника света используют обычные лампы дневного света.

Каждые три дня часть воды ($\frac{1}{4}$ – $\frac{1}{5}$ часть) заменяют свежей. Первоначальный объем воды в аквариумах поддерживают, доливая воду вместо испарившейся. Добавляемая вода должна быть той же температуры, что и в аквариуме. Ил со дна аквариума необходимо убирать регулярно при помощи сифона. Перед размещением рыб аквариумы засаживают растениями. Предпочтение следует отдавать густым мелколистным растениям без жестких, режущих кромок (например, зеленая водоросль рода *Enteromorpha*, которая развивается при хорошем освещении и служит для гуппи укрытием и кормом) и обязательно плавающим растениям (риччия, сальвиния). Спереди или в центре аквариума должно быть свободное пространство для плавания. Кроме рыб в аквариум рекомендуется также заселять живых дафний для создания натурального биоценоза.

3. Кормление.

Кормят гуппи сухим (комбинированный корм, дафнии) или живым кормом (дафнии, коретра) 1–2 раза в сутки, производителей чаще – 3–5 раз. Корм вносят в таком количестве, чтобы рыбы съедали его без остатка за 3–5 мин, поскольку излишки приводят к ухудшению качества воды в аквариуме.

4. Получение тест-культуры.

Самцов и самок содержат в отдельных аквариумах, так как при совместном содержании самцы растут медленнее и имеют меньшие размеры. Для получения молоди отбирают производителей не старше 2 лет без каких-либо признаков заболевания и за три дня до постановки опытов помещают их в общий аквариум для спаривания. Гуппи относятся к рыбам с внутриутробным развитием икры, которые способны к нересту полностью сформировавшихся мальков. Соотношение самок и самцов должно составлять приблизительно 2:1 или 3:1. Необходимо учитывать тот факт, что однажды оплодотворенная самка может нереститься несколько раз.

Самку готовят к нересту, помещая в отдельную нерестовую емкость вместимостью не менее 5 дм³. Готовность самки к нересту определяется наличием хорошо заметного темного пятна перед анальным плавником, при этом форма брюшка приближается к прямоугольной и оно становится намного шире спины. Нерестовые сосуды заполняют водой такого же качества, как и для содержания производителей, и термостатируют при температуре (25 ± 1) °С. После окончания нереста самок изолируют, поскольку они поедают потомство.

Мальки, как правило, рождаются совершенно сформированными. Лучшим кормом для них является «пыль», состоящая из представителей разных морских организмов: инфузорий, коловраток, молоди ветвистоусых рачков и науплиусов веслоногих рачков. При отсутствии «пыли» молодь гуппи можно кормить измельченным сухим кормом. На 100 рыб вносят не более 1 г сухого корма в сутки. По мере роста в рацион рыб вводят измельченный живой корм (резаный трубочник, мотыль, коретра и другие живые корма). Одно-, двухнедельных мальков кормят до 5 раз в сутки, более взрослых – 2–3 раза. Вносимые порции корма должны быть небольшими и поедаться рыбами в течение 3–5 мин.

Мальков сортируют, чтобы избежать неравномерности развития, и постепенно переводят из нерестовых аквариумов в выростные, сначала вместимостью 50 дм³, а далее – 200 дм³. Аквариумы заполняют водой такого же качества, как и для производителей гуппи. С появлением первых признаков половых различий самцов отделяют от самок и выращивают в отдельных аквариумах.

Мальки становятся половозрелыми в 4–6 мес.

5. Проверка пригодности тест-культуры для биотестирования.

Не реже одного раза в полгода мальков гуппи в возрасте 24–48 ч проверяют на пригодность к биотестированию с использованием в качестве эталонного вещества двуххромовокислого калия (K₂Cr₂O₇). С этой целью устанавливают ЛК50 за 96 ч биотестирования (ЛК50-96) раствора эталонного вещества K₂Cr₂O₇. Для этого готовят исходный раствор K₂Cr₂O₇ с концентрацией 10 г/дм³, используя дистиллированную воду. Далее из исходного раствора готовят серию растворов с концентрациями K₂Cr₂O₇ от 100 до 200 мг/дм³ с интервалом 25 мг/дм³, используя воду питьевого качества. Биотестирование этих растворов проводят продолжительностью 96 ч в соответствии с процедурой, изложенной ранее (подразд. 10.3). На основании полученных результатов рассчитывают ЛК50-96.

Тест-культура считается пригодной для биотестирования, если полученная величина ЛК50-96 находится в экспериментально установленном диапазоне реагирования тест-объекта – 45–60 мг/дм³ K₂Cr₂O₇. Если ЛК50-96 для K₂Cr₂O₇ не находится в указанном диапазоне, необходимо проверить условия культивирования с целью установления причин ухудшения состояния культуры.

11. ЭКОЛОГО-МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И ЭТОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКА ЖИЗНЕСТОЙКОСТИ ЛИЧИНОК И МОЛОДИ

Жизнестойкость, в отличие от выживаемости, характеризует функциональную устойчивость молоди рыб к неблагоприятным факторам внешней среды. Уровень жизнестойкости определяет уровень готовности молоди, в первую очередь, к выпуску в естественные водоемы.

Мониторинг качества молоди является важным элементом искусственного воспроизводства рыб (например, искусственное воспроизводство на рыбоводных заводах и программы восстановления запасов) и должен проводиться не только перед выпуском молоди в естественные водоемы, но и в течение всего технологического цикла. В ходе мониторинга необходимо осуществлять контроль за соответствием всех показателей нормативным значениям. Полифункциональная оценка необходима также для отбора молоди рыб в маточные стада, выпуска и товарного выращивания. В последнем случае молодь должна иметь высокие темпы роста, упитанность, низкие кормовые коэффициенты, при этом жесткости отбора по адаптивным фитнес-показателям не требуется. Эффект доместикации производителей в маточных стадах на рыбоводных заводах и полученного от них потомства обусловлен искусственным отбором на приспособленность к заводским условиям и может неблагоприятно отразиться на выживании молоди и состоянии популяций в естественных условиях. Кроме того, доместикация может привести к ослаблению фитнес-показателей, выражающемуся в снижении сопротивляемости к заболеваниям и экстремальным экологическим воздействиям, аномалиям воспроизводительной системы рыб и т. д.

Прижизненные методы оценки качества и контроль развития потомства должны соответствовать следующим основным требованиям:

- включать совокупность показателей, комплексно характеризующих функциональное состояние выращиваемой личинки и молоди;
- сокращать время проведения опытов, травматизм и гибель исследуемых предличинок, личинок и молоди;
- предусматривать возможность оценки информации о перспективах дальнейшего выживания, нормального развития, воздействии на жизнеспособность и генетическую структуру популяции рыб;
- включать систему показателей, экологически адекватно связанных с основными факторами, определяющими выживаемость молоди после выпуска ее в естественные водоемы.

Методы оценки жизнестойкости молоди рыб разберем на примере осетровых.

11.1. Прижизненные методы оценки – экспресс-тесты

Указанным выше требованиям соответствуют следующие экспресс-тесты качества потомства осетровых рыб, полученного на осетровых рыбоводных заводах:

1. Видоспецифические особенности реакции предличинок на изменение глубины.

Оценка качества предличинок производится с использованием видоспецифической поведенческой реакции осетровых на перепад глубины. Только нормальные жизнеспособные предличинки могут осуществлять «свечки». Такая поведенческая реакция объясняется естественными условиями реки с различным донным покрытием (галечное или илисто-песчаное). В отличие от галечного, илистое дно менее пригодно для предличинок (хуже кислородный режим, большая вероятность заиливания, наличие мелких хищников). Жизнеспособные предличинки, попадая в неблагоприятные условия реки, увеличивают интенсивность «свечек», что способствует сносу их течением на более благоприятные участки реки. Предличинки с различными морфологическими дефектами головного отдела, сердца, желточного мешка и т. д. не способны после вылупления совершать периодические вертикальные подъемы и в естественных условиях реки могут попасть в участки с большей глубиной и погибнуть в результате заиливания. О качестве потомства можно судить по интенсивности подъемов «свечек» (табл. 11.1). Интенсивность «свечек» у предличинок белуги и русского осетра повышается в период, следующий за вылуплением. Поскольку предличинки севрюги, содержащиеся при более высокой температуре, переходят на жаберное дыхание в первые 24 ч после вылупления, то максимальная интенсивность всплываний приходится именно на этот период.

Таблица 11.1. Максимальная интенсивность «свечек» предличинок осетровых на разных глубинах

Вид рыбы	Возраст, сут	Глубина, см	
		20	100
Русский осетр	3	1,6	0,7
Севрюга	1	2,1	1,7
Белуга	5	4,1	1,1

После перехода на жаберное дыхание частота «свечек» снижается и предличинки начинают совершать горизонтальные перемещения, а к моменту перехода на смешанное питание эта частота приближается к нулю. В первые трое суток предличинки русского осетра и севрюги наиболее чувствительны к перепадам глубины. У белуги реакция на перепад глубины слабее из-за менее развитого органа стато-акустики на данной стадии. Сразу после вылупления проводят тестирование с целью оценки процента предличинок, адекватно реагирующих на перепад глубины. Этот тест также можно использовать для оценки качества производителей по качеству потомства и при отборе личинок для формирования или пополнения ремонтно-маточных стад.

2. Плавательная способность личинки и молоди осетровых рыб.

Следующим тестом, позволяющим оценить жизнеспособность личинок и молоди осетровых, является тест «реореакция», или так называемый «реотаксис», заключающийся в том, что, находясь в потоке воды, рыбы, как правило, двигаются против течения. Данный тест предполагает определение времени, в течение которого рыба может двигаться в потоке воды с определенной скоростью. Плавательная способность молоди осетровых определяется в экспериментальных условиях с применением гидролотка с постоянной глубиной, аналогичного лотку Бэмса, начиная со стадии вылупления предличинок. До перехода предличинок на экзогенное питание скорость течения в лотке поддерживается равной 15,8 см/с, а на более поздних стадиях развития она увеличивается до 20,6 см/с. Следует отметить, что важное значение в поддержании плавучести и сопротивляемости потоку имеет общая сформированность тела и расположение плавников. В первые дни после вылупления предличинки осетровых еще лишены плавников, их хвостовой отдел слаб, поэтому они способны совершать только вертикальные всплытия («свечки»), осуществляя их за счет волнообразных движений всего тела. С переходом на активное питание тело личинок приобретает форму, характерную для взрослых рыб, с большим хвостовым удлинением, особым строением рыла (рострума), способствующим поддержанию плавучести и уменьшению сопротивления при движении. Увеличение времени сопротивляемости потоку связано с переходом личинок на внешнее питание.

В период перехода на внешнее питание плавательная способность личинок белуги составляет 120 с, осетра – 180, севрюги – 80 с (при скорости течения 15,8 см/с). Увеличение скорости течения в лотке до 20 см/с приводит к способности (табл. 11.2).

Таблица 11.2. Изменение плавательной способности личинок и молоди осетровых в потоке воды скоростью 20 см/с

Температура воды, °С	Возраст, сут	Длина, мм	Масса, мг	Плавательная способность, с
Русский осетр				
19,5–21,6	8–9	18,4–19,7	34,0–39,8	45,0
22,0–22,4	13–18	23,4–25,0	48,0–79,3	64,0
Севрюга				
22,3–22,4	5–6	16,2–17,0	26,4–26,6	15,0
22,5–22,9	8–15	21,0–23,4	31,0–65,0	48,0
Белуга				
19,2–21,1	10–11	21,5–22,0	69,5–72,4	30,8
22,5–22,9	16–20	28,0–34,0	74,0–89,0	95,0

У личинок севрюги старшего возраста плавательная способность выше, чем у личинок русского осетра и белуги. Это связано с особенностями строения тела севрюги (максимальная толщина тела на 6,1 % меньше, чем у белуги) и ее приспособленностью сопротивляться потоку воды. Так, молодь севрюги длиной 22 мм может сопротивляться потоку в течение 48 с, длиной 60 и 90 мм – 350 и более 3600 с соответственно. У заводской и у дикой молоди увеличение плавательной способности зависит от длины рыб. Так, молодь севрюги заводского происхождения длиной 45 мм имеет плавательную способность 467 с, при длине 77,5 и 128 мм – 1499 и 2536 с соответственно (при скорости течения в лотке 20 см/с). У молоди севрюги, полученной от естественного нереста, при средней длине тела 62,6 мм плавательная способность равна 357 с, при длине 68,8, 107,8 и 115 мм – 367, 651 и 1390 с соответственно. Плавательная способность молоди стерляди также зависит от ее размеров. Так, при длине 65 мм она составляет 125 с, при длине 95 мм – 940 с, а при длине 125 мм – 1280 с.

3. Оценка размеров и формы желточного мешка предличинки.

Следует отметить важность оценки размеров и формы желточного мешка (рис. 11.1) при осуществлении рыбоводно-экологического мониторинга предличинок, выращенных на осетровых заводах.

Важным показателем деформации желточного мешка предличинок осетровых является отношение его высоты к длине (составляющее в норме от 0,55 до 0,69). Для деформированного (грушевидного или удлинненно-овального) желточного мешка данное отношение уменьшается до 0,29–0,44.

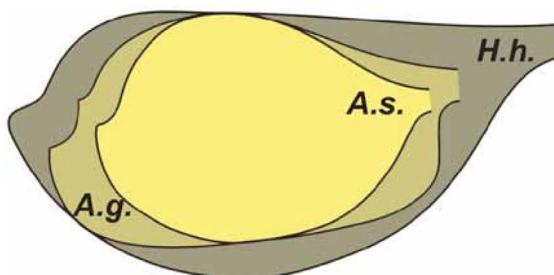


Рис. 11.1. Вид желточного мешка у предличинки разных видов осетровых на стадии 36 (сбоку): *H. h.* – *H. huso*; *A. g.* – *A. gueldenstaedtii*; *A. s.* – *A. stellatus*

В случае небольших размеров желточного мешка (и значительной индивидуальной изменчивости его морфометрических показателей) эндогенные ресурсы не обеспечивают дальнейший рост и нормальное развитие на одном из наиболее важных этапов – переходе к экзогенному питанию. Вместе с тем излишне большой объем желтка на стадиях дифференцировки отделов пищеварительной системы негативно влияет на их формирование, приводя к задержке секреторной функции эпителия.

11.2. Анафазный метод учета хромосомных aberrаций у предличинки

Данный метод позволяет проводить прямой учет в клетках зародышей рыб частоты хромосомных нарушений, которые могут быть вызваны как мутагенами, так и отклонениями условий содержания от оптимальных. Оценка хромосомных aberrаций является приемлемым параметром для мониторинга физиологического состояния самок, качества икры, условий искусственного нереста и оптимальных условий содержания осетровых рыб.

При регистрации хромосомных повреждений учитываются одиночные и групповые хромосомные и хроматидные мосты, парные и одиночные фрагменты, отставание хромосом, многополюсные митозы. При этом aberrантные митозы подсчитываются как одиночные повреждения, независимо от числа aberrаций на митоз. После оценки количества нормальных и aberrантных анафаз-телофаз рассчитывается процент aberrантных клеток по формуле

$$A / B \cdot 100,$$

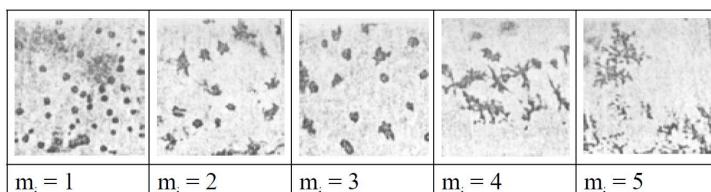
где А – количество клеток с нарушениями, шт.;

В – общее количество клеток, шт.

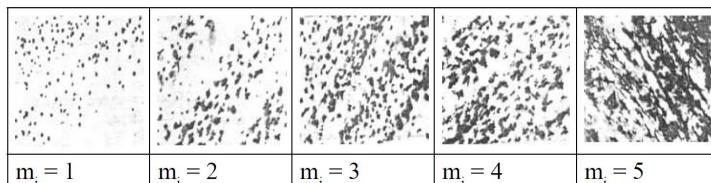
Фоновый природный уровень мутирования у предличинок русского осетра на рыбоводных заводах Азовского бассейна в последние 20 лет лежал в пределах 1,45–5,3 %.

11.3. Оценка физиологического состояния личинок осетровых по «фоновым» реакциям пигментных клеток (меланофоров)

Оценка физиологического состояния личинок осетровых по «фоновым» реакциям меланофоров (пигментных клеток) отражает состояние нейрогормональной системы, определяющей возможности личинок и молоди к образованию покровительственной окраски и выживанию ее в естественных водоемах. Для оценки степени агрегации и дисперсии пигмента в меланофорах предложена пятибалльная шкала меланофоровых индексов (m_i) (рис. 11.2). Максимальное значение, равное 5, соответствует максимальной дисперсии пигмента и потемнению окраски тела, а минимальное значение, равное 1, – максимальной агрегации пигмента и светлой окраске тела.



a



б

Рис. 11.2. Пятибалльная шкала для оценки функционального состояния меланофоров по величине меланофорового индекса (m_i) у осетровых:
a – на личиночном этапе развития (меланофоры головы и боковой поверхности тела); *б* – молоди осетровых (меланофоры грудных плавников)

Для личинок осетровых оценивается состояние меланофоров головы и боковой поверхности тела; для молоди – меланофоров грудных плавников. Установлено, что неадекватная пигментная реакция характерна только для отстающей в развитии молоди.

Своевременная и адекватная адаптивная реакция меланофоров на темный и светлый фон свидетельствует о функциональной норме элементов нейрогормональной системы у осетровых рыб (рис. 11.3).

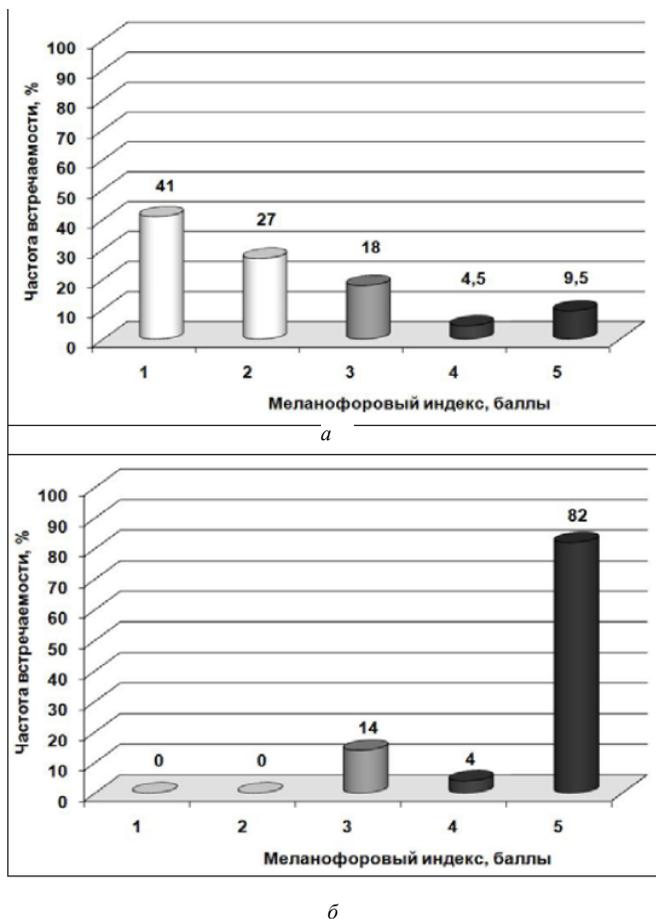


Рис. 11.3. Экспериментальная оценка пигментных реакций молоди русского осетра: *а* – светлые емкости; *б* – темные емкости

В отличие от традиционной методики с фиксацией молоди в этаноле, приводящей к ее гибели, для удобства обработки результатов тестирования на персональном компьютере и сохранения молоди, используемой в экспресс-тесте, в настоящее время рекомендовано применять цифровую фотосъемку тестируемых личинок и молоди. Применение данного метода позволяет проводить количественную оценку в баллах степени агрегации или дисперсии пигмента у молоди осетровых.

11.4. Тератологический анализ личинок и молоди

Тератологический анализ личинок и молоди различных видов рыб позволяет оценить частоту встречаемости различных морфологических аномалий потомства (табл. 11.3), полученного на заводах от диких и домашних производителей.

Таблица 11.3. Различные группы аномалий осетровых в раннем онтогенезе

Группа аномалий	Проявление
Аномалии формы тела	Изменение формы головы, искривление тела и хвостового стебля; недоразвитие грудных плавников; дефекты строения плавниковой каймы; неправильная форма желточного мешка и т. д.
Аномалии строения наружных органов	Увеличение железы вылупления; отсутствие глаз (одного или обоих) и изменение их размеров; катаракта; недоразвитие жаберных крышек; дефекты развития усиков; аномалии в строении органов обоняния (несращение перемычки обонятельных органов, недоразвитые обонятельные ямки и т. д.); истончение и разрывы брюшной стенки и т. д.
Аномалии строения внутренних органов	Отсутствие четвертого желудочка продолговатого мозга (либо малые размеры его); аномалии в строении сердца (недоразвитие сердечной трубки, изгиб сердечной трубки в левую сторону); аномалии пищеварительной системы (наличие первичной перегородки между глоткой и пищеводом, недоразвитие печени, пилорических придатков, дефекты промежуточной и спиральной кишок и т. д.)
Аномалии строения тканей	Отслоение, истончение и разрывы покровного эпителия; эпителиальные наросты на туловище, хвосте, плавниках; опухолевидные образования на теле и хвосте, плавниках, тканях, желточном мешке; нарушение пигментации кожи; наличие полостей в поперечнополосатой мышечной ткани

Группа аномалий	Проявление
Функциональные аномалии	Кровоизлияния в различных органах и тканях (сердце, мозге, печени, плавниковой кайме и т. д.); нарушение водно-солевого обмена (гидроцефалия головного мозга, водянка перикарда, желточного мешка, плавниковой каймы, брюшной полости); нарушение липидного обмена (наличие жировых капель в ротовой полости, в перикарде под эпителием брюшка, в средней кишке и т. д.)
Механические аномалии	Переломы тела и хвостового стебля; разрывы наружных покровов; отсутствие части хвоста и плавников вследствие механического воздействия и каннибализма

Поскольку более детальное описание морфологических аномалий осетровых рыб на различных этапах раннего онтогенеза не входило в задачи данного пособия, читателям следует обратиться к специальным изданиям, например к атласу. Многие из перечисленных выше аномалий снижают жизнестойкость молоди, а некоторые приводят к гибели. Однако некоторые аномалии не оказывают существенного влияния на жизнеспособность личинок и молоди (например, несращение перемычек обонятельных органов, отсутствие одного или обоих глаз, незначительные дефекты в структуре мышечной ткани, укорочение плавников) и встречаются у взрослых рыб в аквакультуре.

11.5. Оценка адаптационных качеств молоди по реакциям центральной нервной системы

Тест «открытое поле» (рис. 11.4), разработанный для оценки адаптационных качеств молоди по реакциям центральной нервной системы (ЦНС), позволяет оценить уровень двигательной активности молоди, ее реактивность на внешние стимулы (зрительные, тактильные, гидродинамические), ее пригодность для выживания в естественной среде. При проведении опыта определяют остроту реакции молоди из тестируемой выборки на различные раздражители (свет и звук разной частоты). Для этого молодь помещают в круглый аквариум (диаметром 1 м), дно которого разделено на восемь секторов, и регистрируют количество пересечений рыбой линий дна за определенный отрезок времени. Хронологическая схема проведения опытов приведена в табл. 11.4.

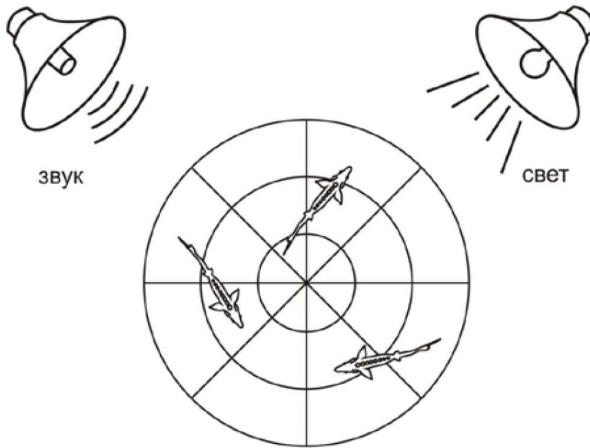


Рис. 11.4. Тест «открытое поле»

Таблица 11.4. Хронологическая схема проведения теста «открытое поле»

Время, мин	Раздражающие элементы (стрессоры)
1–3	Адаптация рыбы в новых условиях (экспериментальные емкости)
3–5	Постадаптационный период
Воздействие звуком низкой частоты	
5–7	Наблюдение за реакцией на звук
Воздействие звуком высокой частоты	
7–9	Наблюдение за реакцией на звук
Воздействие постоянным светом	
9–11	Наблюдение за реакцией на свет
Воздействие кратковременными вспышками света	
11–13	Наблюдение за реакцией на свет

Адаптация рыбы к новым условиям занимает около 3 мин, в течение которых определяют ориентировочную двигательную активность (ОА, ед/мин) путем подсчета среднего количества пересеченных рыбой линий. После того как двигательная активность рыб становится относительно постоянной, рассчитывают усредненное количество пересечений линий дна и принимают это значение за фоновую активность (ФА, ед/мин). После воздействия раздражающим элементом определяют реактивность (РА, ед/мин) – среднее количество пересечений за следующие 30 с. При этом у молоди может наблюдаться как

положительная, так и отрицательная реакция на внешние раздражители. На основе полученных абсолютных характеристик рассчитываются относительные показатели (ОА и РА), позволяющие оценить степень двигательной активности молоди осетровых под действием сильных сенсорных стимулов:

$$ПА = ОА / ФА \cdot 100;$$

$$ПР = РА / ФА \cdot 100,$$

где ПА – показатель активации, %;

ОА – ориентировочная двигательная активность, ед/мин;

ФА – фоновая двигательная активность, ед/мин;

ПР – показатель реактивности, %;

РА – реактивность, ед/мин.

В качестве примера в табл. 11.5 приведены данные сравнительного анализа показателей двигательной активности в тесте «открытое поле» молоди севрюги, полученной от одомашненной формы и диких производителей, заготовленных в Азовском море.

Таблица 11.5. Показатели двигательной активности
молоди севрюги разных групп

Группа	ОА	ФА	ПА	Пр ₁	Пр ₂	Пр ₃	Пр ₄
Дикая	34,5	13,2	261,3	110,2	132,9	99,5	89,7
Одомашненная	39,7	19,7	201,5	88,9	71,3	57,5	42,9

Примечание. ОА – ориентировочная двигательная активность; ФА – фоновая двигательная активность; ПА – показатель активации; Пр₁ – показатель реактивности в первые 30 с после воздействия низкочастотным звуком; Пр₂ – показатель реактивности в первые 30 с после воздействия высокочастотным звуком; Пр₃ – показатель реактивности в первые 30 с после воздействия постоянным светом; Пр₄ – показатель реактивности в первые 30 с после воздействия кратковременными вспышками света.

Оценку пригодности заводской молоди осетровых к выживанию в естественных водоемах путем использования теста «открытое поле» и определение плавательной способности посредством сортировки молоди в гидродинамических лотках с регулируемой скоростью течения в условиях осетровых заводов эффективнее осуществлять в специализированной установке «Ихтиотест».

11.6. Нейрофармакологическое тестирование

Нейрофармакологическое тестирование молоди, основанное на оценке устойчивости ее к стрессирующим абиотическим воздействиям, также является способом прижизненной экспресс-оценки (менее 30 мин) жизнестойкости рыб. Значительным преимуществом метода является техническая простота применения, позволяющая осуществить нейрофармакологическую оценку в производственных масштабах при выпуске молоди в естественные водоемы или отборе рыб в ремонтную часть стада. Более устойчивая к нейротропным препаратам молодь отличается повышенной жизнестойкостью и устойчивостью к экстремальным значениям температуры и солености, дефициту кислорода, сенсорным воздействиям и обладает более рациональным уровнем обмена веществ. Методика основана на определении продолжительности действия раствора анестетика, вызывающего устойчивую наркотизацию рыб, выражающуюся в утрате равновесия и прекращении движений хвостового стебля.

Анализ внешней картины влияния наркоза на поведение молоди позволяет выделить три основные стадии:

- повышение двигательной активности с последующим нарушением координации движения;
- подавление фоновой активности рыб, потеря рефлекса равновесия;
- выключение внешнего дыхания и обездвиживание рыб.

Восстановление жизнедеятельности наркотизированных рыб при помещении их в чистую воду происходит в обратной последовательности. Следует отметить, что существуют видовые различия реакции молоди осетровых рыб с разной массой на воздействие нейрофармакологического препарата (табл. 11.6).

Таблица 11.6. Динамика обездвиживания при наркотизации MS-222 с концентрацией 50 мг/л и возвращения двигательной активности молоди осетровых рыб (% от общего числа)

Вид рыбы	Время наркотизации, мин						Время реанимации в чистой воде, мин					
	5	10	15	20	25	30	1	2	3	4	5	6
Севрюга (крупная)	10	60	80	80	–	–	40	60	70	100	–	–
Севрюга (мелкая)	20	20	20	80	80	80	40	50	100	–	–	–
Осетр персидский	–	30	30	60	70	70	30	40	40	40	80	80
Осетр русский	–	30	40	40	70	70	30	40	40	50	80	100

Для экспресс-анализа могут быть также использованы и другие нейрофармакологические препараты: хинальдин (2-метилхинолин), гвоздичное масло, гидрохлорид хинолина и др. Нейрофармакологическое тестирование молоди по реакции на воздействие нейротропных веществ проводится при различных концентрациях (50 и 75 мг/л) анестетика MS-222 (трикаинметансульфоната). Время экспозиции зависит от концентрации препарата. При проведении процедуры проводится мониторинг двигательной активности, числа наркотизированных особей и скорости их восстановления в чистой воде. Чувствительность молоди различных видов осетровых рыб к абиотическим стрессорам (высокой температуре воды (32 °С), солености (12 ‰), дефициту кислорода) достаточно тесно коррелирует с их чувствительностью к анестетикам. Это позволяет использовать время наркотизации отдельных особей в качестве интегрального показателя жизнеспособности рыб. Вместе с тем данный метод является прижизненным в отличие от летального метода функциональных нагрузок.

11.7. Изучение поведенческих реакций молоди осетра на запечатленный химический стимул

Изучение закономерностей нерестовых миграций осетровых рыб – одной из наиболее ярких форм мотивационного поведения – одновременно является необходимым элементом при составлении прогноза их промыслового вылова. Воздействие рыбоводства на дальнейшее течение физиологических процессов разводимых видов осетровых, в том числе и на их поведение, остается одним из малоизученных вопросов. Наблюдающееся изменение характера миграционного поведения нерестовой части популяций осетровых рыб, сформированных целиком из особей заводского воспроизводства, еще раз подтверждает тезис, что направления адаптаций реализуются в процессе индивидуального развития под воздействием внешних факторов и в генофонде не заложены. При этом ключевую роль играет не «инстинкт дома», а «условия дома» и только тогда, когда они обеспечивают надежную воспроизводимость вида.

Осетровые рыбы весьма пластичны к факторам внешней среды. Они способны выживать во многих неблагоприятных для вида условиях вследствие высокой адаптационной способности, возникшей в ходе эволюции и реализуемой через нейроэндокринные механизмы регуляции. Система адаптации у рыб созревает в онтогенезе, но работ, свя-

занных с изучением роли раннего онтогенеза в реализации видовых приспособлений у осетровых рыб, сравнительно немного. Таким образом, в современный период, когда в Азовском бассейне единственным способом сохранения этих ценных в промысловом отношении рыб остается их воспроизводство на рыбоводных предприятиях, изучение физиологических механизмов адаптаций в раннем онтогенезе приобретает особую актуальность.

У высших животных (теплокровных) определенные функциональные механизмы, обуславливающие их приспособительную деятельность и поведение, складываются в сравнительно короткий период раннего пре- и постнатального развития, называемого критическим. Менее всего разработана эта проблема в отношении низших животных, в частности в пределах класса рыб: здесь функциональные основы поведенческих стереотипов в раннем онтогенезе изучались менее интенсивно или почти не изучены. Одновременно принято считать, что у рыб влияние нервной системы на поведение в ранний период онтогенеза весьма ограничено вследствие незрелости центральных механизмов регуляции, в том числе и нейроэндокринного звена. Методика регистрации поведенческих реакций молоди осетра на запечатленный ранее химический стимул позволила получить доказательства влияния нервной системы осетровых рыб на поведение начиная с самых ранних этапов онтогенеза.

Участие нервных механизмов реагирования на факторы среды в раннем онтогенезе осетровых рыб и роль этих факторов в модуляции последующего поведения изучалась нами на модели импринтинга химических стимулов личинками русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii* Br.) Импринтинг как наиболее простая форма реализации «нервной памяти» поддается количественной оценке и исследован у рыб. У лососевых рыб избирательная адаптация к химическим раздражителям (обонятельный импринтинг) появляется в основном в период смолтификации и в дальнейшем реализуется в ходе нерестовых миграций. Вероятно, что и осетровые, поскольку они обладают развитой системой химического тестирования среды, могут запечатлять эти сигналы в определенный период онтогенеза и в дальнейшем использовать их в целях ориентации.

Оборудование:

- 1) экспериментальный аквариум с системой оборотного водоснабжения;
- 2) микрокомпрессоры;

3) бассейны или аквариумы для выдерживания рыб.

Реактивы:

1) вещество для определения чувствительности рыб к химическим раздражителям (морфолин);

2) активированный уголь.

Непосредственно после выклева предличинки осетра помещают в заводские бассейны с проточной водой. В качестве модельного вещества для «запоминания» используется морфолин – одорант в очень малых и экологически безопасных концентрациях. Данное вещество вносят по мере вымывания его из бассейнов с определенной скоростью так, чтобы конечная концентрация его составляла 10–10–10–8 М. Срок экспозиции составлял: 4 сут (от 36-й до 40-й стадии развития предличинки), 6 сут (40–45-я стадии), 10 сут (36–45-я стадии), 18 сут (36-я стадия – 8-суточная личинка). Помимо этого предусматривают варианты, где рыб приучают к морфолину после перехода на экзогенное питание (45-я стадия) в течение 8 и 30 сут. Наименование стадий развития приведено по Т. А. Детлаф (Т. А. Детлаф и соавт., 1981).

После экспозиции рыб пересаживают в бассейны с проточной водой без следов морфолина, где и содержат от 3 нед до 1,5 мес. Тестирование молоди проводится группами по 5–7 шт. в экспериментальном аквариуме размером 46×23×20 см с непрерывно действующей системой оборотного водоснабжения. Очистка воды производится с помощью гравия и активированного угля. Аквариум условно разделен на две половины: стартовую и опытную (тестовую). В опытной части аквариума расположено два отсека с параллельными потоками воды, подаваемыми через узкие трубки (рис. 11.5). Адаптация рыб к условиям аквариума проходит при включенной системе оборотного водоснабжения и открытых кранах водоподачи в опытной части аквариума, что в эксперименте позволяет устранить реакцию рыб на включение и выключение потоков. На стимульном интервале один из потоков в произвольном порядке сменяет раствор химического вещества (морфолина 10–8 или 10–9 М). Концентрации веществ применяют в восходящем порядке.

В процессе тестирования молоди осетра, когда оценивают ее реакцию на запечатленный ранее химический стимул, регистрацию параметров двигательной активности проводят путем подсчета количества рыб в тестовой части аквариума (в опытной и контрольном отсеках раздельно) на фоновом, стимульном и в ряде случаев на постстимульном интервалах.

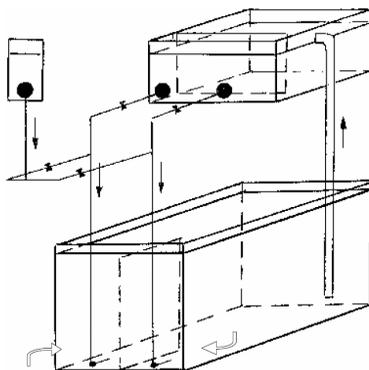


Рис. 11.5. Схематическое изображение экспериментальной установки для изучения поведения молоди осетра (светлыми стрелками обозначены опытные отсеки аквариума, темными – направление движения воды и тестируемого раствора (морфолина); вверху – резервуар для очистки воды, слева – сосуд с раствором морфолина)

Длина интервалов должна быть одинаковой для экспериментов одной серии (3 или 4 мин) и не иметь промежутков. На фоновом интервале в отсеках в экспериментальной части аквариума через пипетки, расположенные у дна, производится непрерывная подача воды. На стимульном интервале в опытном отсеке, выбираемом произвольно, воздействуют тем химическим раздражителем, который ранее предъявляли личинкам на подготовительном этапе. Его подают через пипетки вблизи дна аквариума, в то время как в контрольном отсеке таким же образом подают воду.

Промежуток между отсчетами (шаг) регистрируемых параметров выбирают один раз в начале эксперимента. Величина его может зависеть от величины рыб и аквариума. Для большинства аквариумных рыб промежуток составляет 5–10 с. В данном случае для молоди осетровых рыб, размер которых к моменту начала опытов составлял 4–6 см и более, шаг принят равным 15 с. Таким способом на исследуемых промежутках регистрируют временное изменение числа рыб, находящихся в отсеке.

Поведенческую реакцию рыб можно оценивать несколькими способами (Б. В. Солуха, 1989). В данном случае приведены два способа:

1. О реакции судят по количеству рыб (в процентах по отношению к фону) в опытном отсеке. Результаты вычисляются по формуле

$$\frac{A_1 \times 100}{A},$$

где A – число рыб в отсутствие сигнала, шт.;

A_1 – число рыб при подаче сигнала, шт.

Такой метод оценки дает общую картину реакции. В то же время основным недостатком данного метода является невозможность оценки слабых (пороговых) изменений двигательной активности рыб, а также изменений поведения рыб в процессе тестирования.

2. Каждый эксперимент (реализация) на бумаге представляет собой последовательное изложение регистрируемых параметров (число рыб N). После определения среднего значения на фоновом интервале все значения отсчетов на стимульном (и постстимульном) интервале делят на свое фоновое среднее, таким образом определяют значения частных показателей реагирования для фоновых и стимульных интервалов.

Таким образом, на каждом интервале

$$K_{\phi} = N_{\phi} \text{ для данного интервала} / N_{\text{ср. фона}};$$

$$K_{\text{ст}} = N_{\text{ст}} \text{ для данного интервала} / N_{\text{ср. фона}}.$$

Такой способ оценки более удобен потому, что вариабельность фоновой активности может замаскировать слабые реакции, а нормировка позволяет исключить зависимость оценок реакции от исходной фоновой активности рыб, меняющейся от опыта к опыту, от числа используемых рыб в эксперименте или от влияния предшествующего воздействия. Если поведение на стимульном интервале не отличается от поведения на фоновом интервале, тогда суммарная оценка реакции (величина $K_{\text{п}}$) приближена к единице. Для более точной оценки реакций, что особенно относится к рыбам, выращиваемым исключительно в лабораторных условиях, производится также и оценка поведения рыб в контрольном отсеке.

Частные показатели реагирования K суммируют по вертикали для всего массива данных по определенному виду раздражителя. В результате значение показателя реагирования $K_{\text{п}}$ оказывается равно отношению среднего частных показателей реакции (стимул) к среднему частных показателей контроля (фон).

В данном случае

$$K_{\text{п}} = K_{\text{ст}} / K_{\phi} = 1,6 / 1 = 1,6 \text{ (табл. 11.7).}$$

Таблица 11.7. **Протокол первичной обработки результатов тестирования
молоди осетра**

Кол-во секунд	К для фоновых интервалов (интервал – 15 с)													
	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	
1	2,5	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	0,0	2,5	0,0	К _ф
2	1,6	1,6	0,0	1,6	3,2	1,6	0,0	1,6	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0	
3	0,0	1,2	1,2	0,0	1,2	0,0	1,2	1,2	1,2	2,0	0,0	2,5	1,2	
4	2,2	0,0	2,2	1,1	0,0	1,1	2,2	1,1	1,1	2,2	0,0	0,0	3,3	
<i>n</i>	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	1,0	1,0	2,0	2,0	0,0	1,0	
	1,3	0,6	0,7	0,7	1,9	0,5	0,7	1,0	1,5	1,2	0,4	1,0	1,1	
	К для стимульных интервалов (интервал – 15 с)													К _{ст}
	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	
1	5,0	2,5	5,0	0,0	2,5	2,5	2,5	2,5	0,0	5,0	0,0	2,5	0,0	
2	3,2	3,2	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	3,2	0,0	1,6	1,6	
3	1,2	3,7	2,5	1,2	1,2	0,0	1,2	1,2	0,0	2,5	2,5	2,5	2,5	
4	1,1	1,1	1,1	1,1	2,2	0,0	0,0	1,1	1,1	2,2	2,2	2,2	3,3	
<i>n</i>	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	1,0	1,0	2,0	2,0	0,0	1,0	0,0	2,0	
	2,1	2,1	2,0	1,0	1,5	1,0	1,3	1,7	0,9	2,6	1,1	1,8	1,9	

Изменение поведения – часто наиболее отчетливый показатель неблагоприятных влияний на организм при отсутствии гибели рыб. Причем наиболее уязвимыми могут оказаться чувствительные стадии раннего онтогенеза. Изложенная выше методика пригодна при выявлении степени неблагоприятного воздействия некоторых широко распространенных токсикантов, например обладающих нейротропным действием, на процессы запечатления химического стимула. Под влиянием неблагоприятных воздействий на рыб в ранний период онтогенеза может быть зарегистрировано изменение поведенческих реакций на стадии малька.

При изучении действия ксенобиотиков (например, пестицидов или нефтепродуктов) на процессы химической «памяти» осетровых рыб методика выдерживания личинок и анализа результатов поведенческих экспериментов аналогична вышеизложенной, за исключением того, что подготовительный этап экспериментов (обработка токсикантами личинок в чувствительный для запечатления химических стимулов период) выполняется не в бассейнах, а в лабораторных условиях (аквариумах).

В ихтиологических и физиологических исследованиях осетровых рыб при изучении особенностей их нерестового хода и составлении прогнозов внимание обычно уделяется завершающему этапу – наблю-

дению за зрелой частью популяции. С помощью методики, изложенной в данном подразделе, удалось получить доказательства тому, что качественные изменения поведения, произошедшие в популяции осетровых рыб Азовского бассейна, могут быть связаны с антропогенным воздействием на самых ранних этапах личиночного развития рыб. В этот период осетровые обладают высокой пластичностью нервной системы. Определенные поведенческие стереотипы у взрослых рыб, связанные с поведенческими ответами на химические стимулы и используемые при их ориентации в раннем возрасте, могут модифицироваться. При этом факторы среды (условия обитания молоди) и физиологические особенности (гормональный статус) влияют на способность к фиксации в памяти химических стимулов и изменяют временные параметры чувствительного периода.

11.8. Методы функциональных нагрузок

К наиболее распространенным методам функциональных нагрузок относят методы определения оксирезистентности, терморезистентности, устойчивости к голоданию.

Метод определения оксирезистентности. Определение пороговых концентраций осуществляли в стеклянных емкостях с притертыми пробками, в которые вмонтированы откалиброванные датчики кислорода «Экотест-2000». Емкости помещали в термостатируемый аквариум во избежание резких перепадов температуры. Перед началом опыта определяли исходное содержание растворенного кислорода в воде каждой емкости, а затем в каждую из них помещали по 30 особей стандартной молоди. С течением времени из-за потребления кислорода молодой концентрация его в воде снижалась, что на определенной стадии (пороговое значение концентрации кислорода) приводило к гибели особей. Критерием гибели молоди являлась остановка движения жаберных крышек. В момент наступления удушья каждой особи фиксировали концентрацию кислорода. На основании полученных данных определяли величину стимулирующего действия лазерного излучения для устойчивости молоди осетровых рыб к дефициту кислорода:

$$\gamma O_2 = ([O_2]_k / [O_2]_o) 100,$$

где $[O_2]_k$ – пороговая концентрация растворенного в воде кислорода для контрольной группы, мг/л;

$[O_2]_o$ – пороговая концентрация растворенного в воде кислорода для опытной группы, мг/л.

Метод определения терморезистентности. Опыты по определению терморезистентности проводили в 80-литровых аквариумах, в которые были установлены термоводонагреватели, помпа для перемешивания и принудительной аэрации воды, контактный термометр и садочки, в которые помещались подопытные экземпляры молоди. Опыты ставили по следующей схеме. Аквариум заполняли водой, в которой выдерживали молодь в течение 24 ч без пищи. Затем включали нагреватель и в течение 40–50 мин подогревали воду до 31 °С. Через короткий промежуток времени температура поднималась до 32 °С. Время терморезистентности отсчитывали с момента достижения 32 °С. Содержание кислорода в воде аквариума не падало ниже 7 мг/л. Гибель молоди определяли по остановке движения жаберных крышек. В момент гибели каждой особи фиксировали время терморезистентности. Величину стимулирующего действия лазерного излучения для терморезистентности молоди осетровых рыб определяли по формуле

$$\gamma_t = (t_o / t_k)100,$$

где t_o – продолжительность выживания молоди осетровых рыб при температуре 32 °С, т. е. терморезистентность для опытной группы, мин;

t_k – терморезистентность для контрольной группы, мин.

Метод определения устойчивости к голоданию. Определение устойчивости к голоданию проводили в лотках с проточной водой. Для исключения попадания корма вместе с водой на входе устанавливали сетки из мелкоячеистого капрона. В ходе опыта контролировали температурный режим, содержание кислорода в воде и pH. На основании полученных результатов определяли величину стимулирующего действия для устойчивости молоди осетровых рыб к голоданию:

$$\gamma_{lum} = (HUN_o / HUN_k)100,$$

где HUN_o – средняя продолжительность выживания молоди осетровых в условиях полного отсутствия корма, т. е. устойчивость к голоданию в опытной группе, ч;

HUN_k – устойчивость к голоданию в контрольной группе, ч.

12. РАЗМЕРНО-ВЕСОВЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ

Измерение размерно-весовых показателей рыб и других гидробионтов является неотъемлемой составляющей в ходе выполнения рыбохозяйственных исследований.

К размерно-весовым показателям относят массу, а также длину всей рыбы или определенного морфологического параметра.

Массу рыбы измеряют индивидуально на весах, которые регулярно проходят метрологическую поверку. Индивидуальную массу измеряют в граммах или миллиграммах, в зависимости от возрастной категории, с точностью до десятых. В процессе выполнения взвешивания рыбы необходимо следить, чтобы вода, стекаемая с нее, не вносила погрешностей в процесс взвешивания. Для уменьшения стресса рыбы допускается использование анестезии, если это не будет влиять на ход выполнения исследований. Допускается взвешивание рыбы непосредственно в емкости с водой, которая заблаговременно взвешивается и выставляется на тару. В мониторинговых исследованиях, а также при контрольных обловах допускается массовое взвешивание рыбы одного вида и одного возраста с дальнейшим определением средней массы путем деления общей массы на количество взвешиваемых экземпляров.

12.1. Исследование роста рыбы в рыбоводстве

Рост рыбы изучается путем проведения систематических взвешиваний и измерений (рис. 12.1, 12.2). Чем выше скорость роста рыбы, тем чаще следует проводить ее взвешивание и измерение. В практике рыбоводства контрольные ловы проводятся один раз в десять или пятнадцать дней.

Основные промеры, употребляющиеся для установления характера роста и оценки экстерьера карпа:

- длина тела (l) – расстояние от вершины рыла до конца чешуйчатого покрова или до начала лучей хвостового плавника;
- длина головы (C) – расстояние от вершины рыла до заднего края жаберной крышки;
- наибольшая высота тела (H) – расстояние от самой высокой точки спины (перед спинным плавником) до самой нижней точки брюха;
- максимальный обхват тела (O) – расстояние вокруг тела около первого луча спинного плавника;
- толщина тела (B) – расстояние между боковыми точками на уровне первого луча спинного плавника.

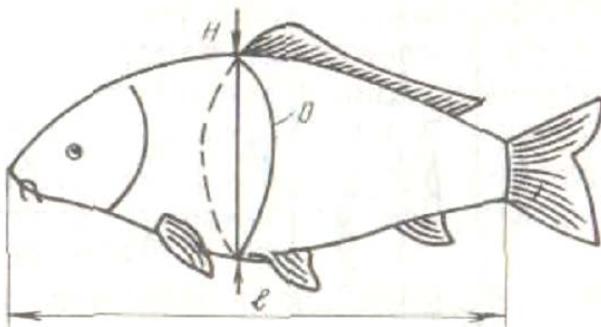


Рис. 12.1. Схема промеров карпа



Рис. 12.2. Процесс измерения карпа

На основании взвешивания и промеров рассчитывают (с точностью до 0,01) индексы телосложения производителей:

– прогонистости (высокоспинности): $K_{п} = l / H$;

– обхвата: $K_{o} = O \cdot 100 / l$;

– коэффициент упитанности: $K_{y} = m \cdot 100 / l^3$;

– большеголовости – отношение длины головы к длине тела: $C \cdot 100 / l$;

– компактности – отношение обхвата тела к длине тела: $O \cdot 100 / l$.

По данным систематических измерений и взвешиваний можно определить скорость роста.

Используя полученные данные длины (l) и массы (W) тела, для определения темпа роста рыб вычисляют абсолютный прирост длины ($l_a = l_2 - l_1$) и абсолютный прирост массы ($W_a = W_2 - W_1$); относительный прирост длины ($l_o = (l_2 - l_1)100 / l_1$) и относительный прирост массы ($W_o = (W_2 - W_1)100 / W_1$); относительный среднесуточный прирост длины ($l_c = l_o / (t_2 - t_1)$) и относительный среднесуточный прирост массы ($W_c = W_o / (t_2 - t_1)$); удельную скорость роста длины ($C_l = (\ln L_2 - \ln L_1) / (t_2 - t_1)100$); удельную скорость роста массы ($C_w = (\ln W_2 - \ln W_1) / (t_2 - t_1)100$).

12.2. Схемы измерения рыб разных семейств

Существует много схем измерения рыб, разработанных как русскими, так и зарубежными учеными. Схемы измерения зависят от семейства исследуемой рыбы. Схемы должны быть однообразны как по линиям промеров, так и по терминологии, чтобы сохранялась сравнимость и преемственность различных (и по времени, и по авторам) работ. На рис. 12.3–12.6 приведены схемы измерения рыб, введенные И. Ф. Правдиным в 1966 г.

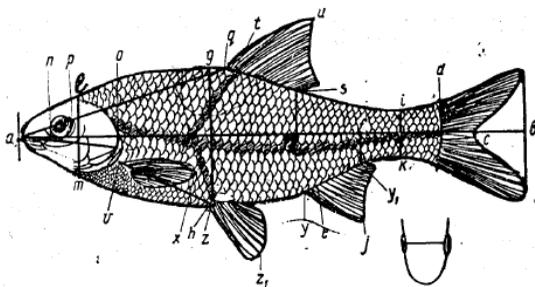


Рис. 12.3. Схема измерений карповых рыб:
 ab — длина всей рыбы; ac — длина по Смитту; ad — длина без C ; ad — длина туловища; an — длина рыла; np — диаметра глаза (горизонтальный); po — заглазничный отдел головы; ao — длина головы; lm — высота головы у затылка; gh — наибольшая высота тела; ik — наименьшая высота тела; aq — антедорсальное расстояние; rd — постдорсальное расстояние; jd — длина хвостового стебля; qs — длина основания D ; tu — наибольшая высота D ; yy — длина основания A ; ej — наибольшая высота A ; vx — длина P ; z_1 — длина V ; uz — расстояние между P и V ; zy — расстояние между V и A . Под главным рисунком справа изображен промер ширины лба.

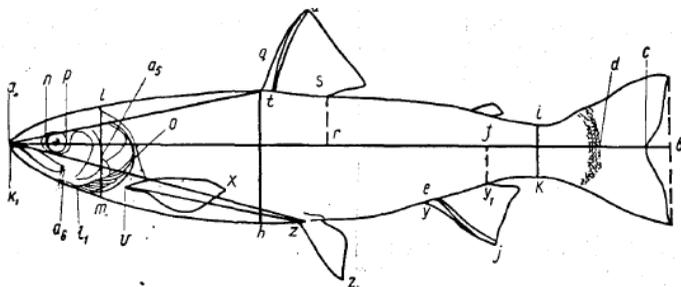


Рис. 12.4. Схема измерений лососевых рыб:

ab — длина всей рыбы; ac — длина по Смитту; ad — длина без C ; od — длина туловища; an — длина рыла; np — диаметр глаза (горизонтальный); aa_s — длина средней части головы; ao — длина головы; po — заглазничный отдел головы; lm — высота головы у затылка; ширина лба (как у карповых); aa_s — длина верхнечелюстной кости; kl_1 — длина нижней челюсти; qh — наибольшая высота тела; ik — наименьшая высота тела; aq — антедорсальное расстояние; rd — постдорсальное расстояние; az — антевентральное расстояние; ay — антеанальное расстояние; fd — длина хвостового стебля; qs — длина основания D ; tu — наибольшая высота D ; yy_1 — длина основания A ; ej — наибольшая высота A ; vx — длина P ; zz_1 — длина V ; vz — расстояние между P и V ; zy — расстояние между V и A .

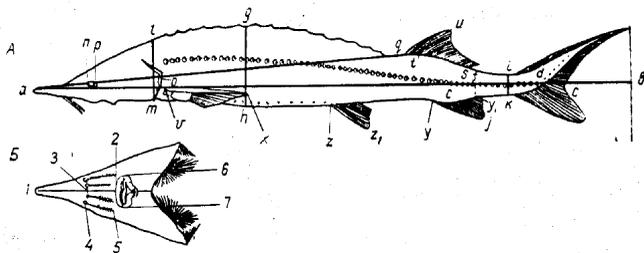


Рис. 12.5. Схема измерений осетровых рыб:

A — ab — длина всей рыбы; ac — длина до конца средних лучей C ; ad — длина до корней средних лучей C ; od — длина туловища; an — длина рыла; np — диаметр глаза (горизонтальный); po — заглазничный отдел головы; ao — длина головы; lm — высота головы у затылка; gh — наибольшая высота тела; ik — наименьшая высота тела; fd — длина хвостового стебля; aq — антедорсальное расстояние; az — антевентральное расстояние; ay — антеанальное расстояние; qs — длина основания D ; tu — наибольшая высота D ; yy_1 — длина основания A ; ej — наибольшая высота A ; vx — длина P ; zz_1 — длина V ; vz — расстояние между P и V ; zy — расстояние между V и A . B . Голова снизу: $1-2$ — расстояние от конца рыла до средних усиков; $4-5$ — длина наибольшего усика; $6-7$ — ширина рта.

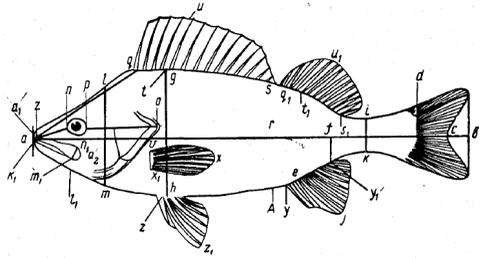


Рис. 12.6. Схема измерений окуневых рыб:

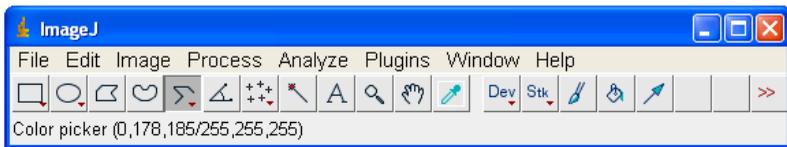
ab — длина всей рыбы; *ae* — длина по Смитту; *ad* — длина без *C*; *od* — длина туловища; *al* — длина рыла; *pr* — диаметр глаза (горизонтальный); *po* — зрительный отдел головы; *ao* — длина головы; *lm* — высота головы у затылка; *a1a2* — длина верхнечелюстной кости; *n1m1* — ширина верхнечелюстной кости; *k1l1* — длина нижней челюсти; *gh* — наибольшая высота тела; *ik* — наименьшая высота тела; *aq* — антедорсальное расстояние; *rd* — постдорсальное расстояние; *az* — антевентральное расстояние; *ay* — антеанальное расстояние; *fd* — длина хвостового стебля; *qs* — длина основания *ID*; *q1s1* — длина основания *ID*; *tu* — наибольшая высота *ID*; *t1u1* — наибольшая высота *ID*; *yy1* — длина основания *A*; *ej* — наибольшая высота *A*; *vx* — длина *P*; *vx1* — ширина основания *P*; *zz1* — длина *V*; *vy* — расстояние между *P* и *A*; *zy* — расстояние между *V* и *A*; *Ay* — расстояние между *anus*'ом и *A*.

Для осуществления измерения удобно пользоваться программой ImageJ, которая позволяет осуществлять измерения рыб из сделанных заранее фотографий. Измеряемая рыба должна быть сфотографирована рядом с каким-нибудь объектом с известной длиной. Например, с линейкой.

Для компьютерного анализа используют программу ImageJ, которую можно скачать по веб-ссылке

<http://imagej.nih.gov/ij/download/win32/ij148-jdk6-setup.exe> или на сайте <http://imagej.nih.gov/ij/>.

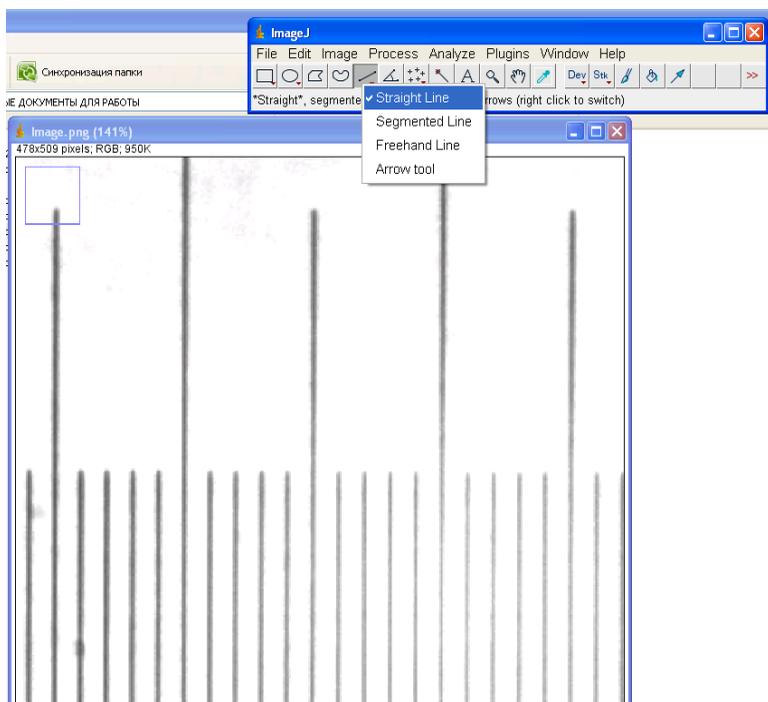
После установления открываем программу ImageJ.



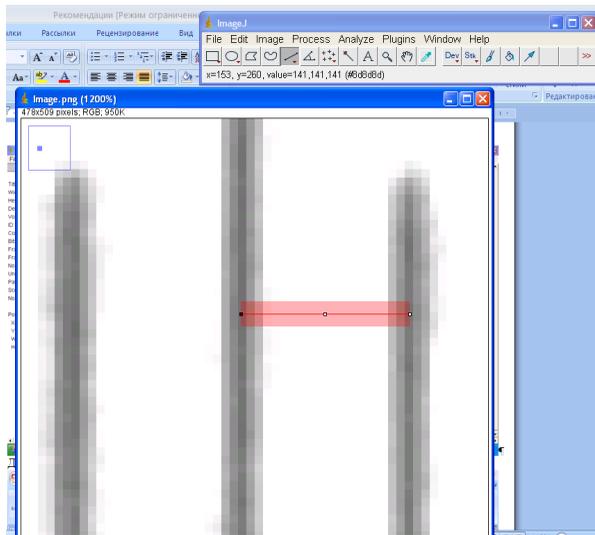
Открываем рисунок с исследуемой рыбой, используя меню File → Open.



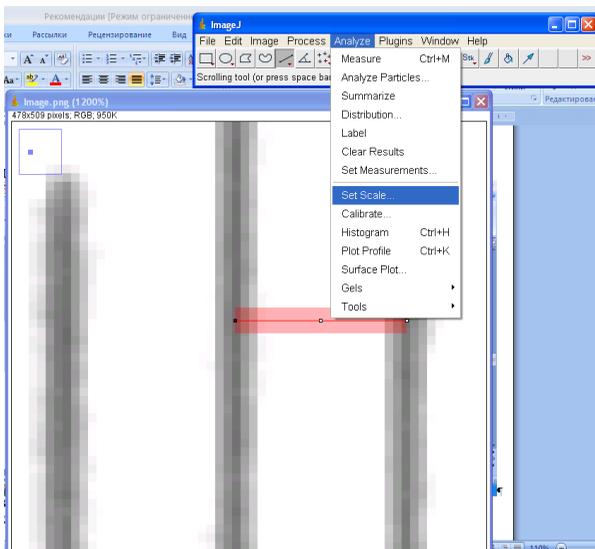
Приближаем изображение к линейке. Выбираем инструмент «Линейка».



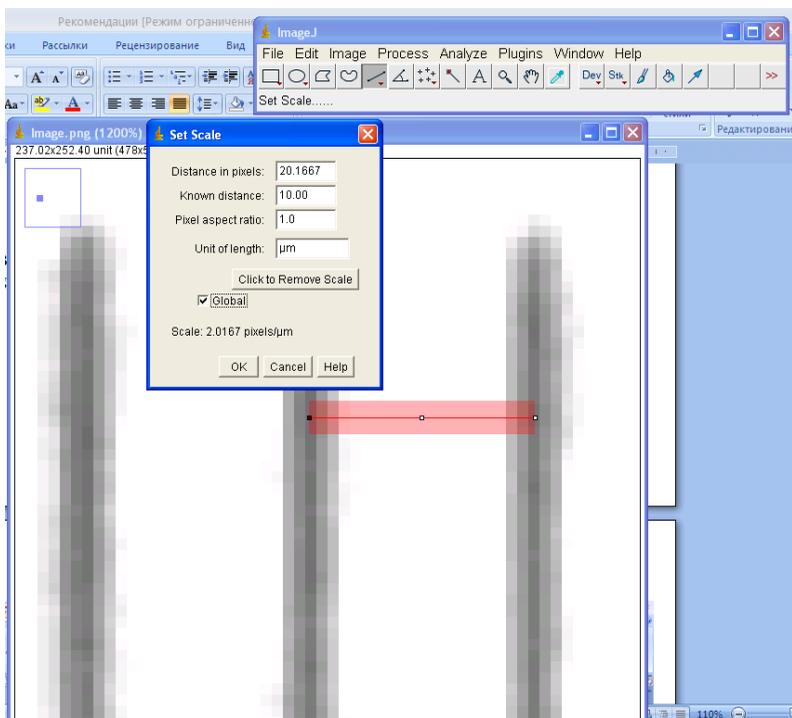
Измеряем шкалу деления в длину. Для точности измерения рисунок увеличиваем.



Далее эту длину надо откалибровать. Выбираем Analyze → Set Scale.



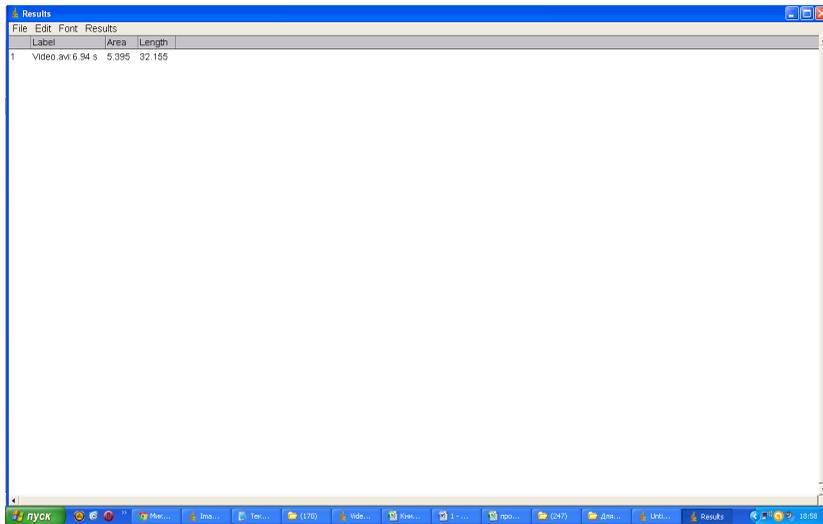
В графе Known distance (Известная дистанция) указываем известное значение единицы деления. В графе Unit of length (единица измерения длины) указываем единицу измерения, например мм (миллиметр). В строке Global ставим галочку, для того чтобы данные калибровки сохранялись при последующих измерениях (при условии, что другие изображения фотографировались с одинакового расстояния и при одинаковом разрешении).



Осуществляем измерение рыбы по одной из вышепредставленных схем.



После каждого измерения необходимо нажимать клавишу <M> (в английской раскладке) для того, чтобы зафиксировать измерения. После этого появляется меню с измерениями.



	Label	Area	Length
1	Video.avi 0.31 s	2.729	17.163
2	Video.avi 0.73 s	6.722	42.158
3	Video.avi 1.08 s	9.375	58.939
4	Video.avi 0.32 s	3.209	20.390
5	Video.avi 1.18 s	11.321	71.146
6	Video.avi 2.89 s	2.527	15.799
7	Video.avi 0.58 s	5.433	34.073
8	Video.avi 0.18 s	1.592	9.964
9	Video.avi 0.63 s	6.596	41.410
10	Video.avi 0.63 s	6.596	41.410
11	Video.avi 2.77 s	0.682	0.318
12	Video.avi 1.87 s	20.924	14.468
13	Video.avi 1.85 s	15.693	10.904
14	Video.avi 1.51 s	1.819	1.112

После завершения измерения одной рыбы накопившиеся измерения копируются для дальнейшей статистической обработки.

13. ПОИСК НАУЧНОЙ ИНФОРМАЦИИ

Основной результат научного труда – это информация, которая отражается в книгах, статьях и других публикациях. Каждое поколение ученых занято не только получением новых данных, но и проводит огромную работу по систематизации всей суммы ранее накопленных знаний. В настоящее время поток научной информации настолько возрос, что его называют информационным взрывом. По данным ЮНЕСКО, в начале XIX в. во всем мире выходило около 100 научных журналов. К 1850 г. их количество достигло 1000, к 1900 г. – превысило 10000, а в настоящее время – около 100000. Управлять этим потоком без определенных знаний невозможно. Поиск информации часто трудоемок не только из-за обилия литературы, но и рассеянности данных, т. е. опубликования статей определенной тематики в непрофильных источниках. Поэтому минимум библиотечно-библиографических знаний облегчит поиск информации и даст возможность значительно эффективнее работать с ее источниками. Рассмотрим основные источники научной информации.

Издающие организации

К наиболее крупным универсальным российским издательствам относятся:

Академиздатцентр «Наука» РАН. Осуществляет основную издательскую деятельность РАН. Старейшее отечественное научное издательство, которое в 2014 г. отметило 290-летие, и крупнейшая издательская организация страны, одна из крупнейших в мире. Имеет филиалы в Новосибирске, Санкт-Петербурге и других городах.

Международная академическая издательская компания (МАИК) «Наука/Интерпериодика». Создана в 1992 г. для издания научных журналов, с 1997 г. издает научно-популярную и учебную литературу. В 1992 г. МАИК «Наука/Интерпериодика» начала свою деятельность с выпуска 5 журналов на английском языке. К 2001 г. их количество возросло до 95. Совместно с Академиздатцентром «Наука» издает более 100 журналов на русском языке.

«Высшая школа» – специализированное государственное издательство по выпуску учебной и методической литературы.

«Мир» выпускает переводную литературу по фундаментальным исследованиям в области естественных наук, а также учебную, справочную и научно-популярную литературу.

«*Научный мир*» издает научную, научно-популярную, учебно-методическую литературу, в основном при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ).

Издательство МГУ выпускает литературу практически по всем областям современной науки.

Издательство СПбГУ ежегодно издает более 200 наименований учебной, научной и научно-популярной литературы по всем разделам естественных наук.

Существует также много издательств, специализирующихся на выпуске литературы по отдельным отраслям («*Недра*», «*Медицина*», «*Гидрометеоиздат*» и др.). Кроме этого многие НИИ и вузы имеют собственные издательские структуры.

С описанием изданий (журналы, монографии, энциклопедии и пр.) крупных зарубежных общенаучных издательств можно ознакомиться на их сайтах:

AcademicPress и **Elsevier**: <http://www.sciencedirect.com/>;

Blackwell: <http://www.blackwell-synergy.com/>;

Cambridge University Press: <http://www.journals.cup.org/>;

J. Willey Interscience: <http://www.interscience.wiley.com/>;

Kluwer: <http://www.wkap.nl/>;

Oxford University Press: <http://www.oup.co.uk/>;

Springer Verlag: <http://www.springerlink.com/>.

В большинстве случаев, к сожалению, доступ к полнотекстовым версиям изданий платный, а бесплатно можно получить лишь название статьи (книги), фамилии и адреса авторов и краткое резюме. Но благодаря РФФИ для всех академических институтов и многих вузов эта проблема в значительной степени (но не полностью) решена. Создана Научная электронная библиотека: <http://elibrary.ru>.

В ней сосредоточены полнотекстовые версии журналов многих зарубежных издательств (Elsevier, Springer Verlag, Academic Press и др.).

Библиотека охватывает период с 1995–1997 гг. и по настоящее время. Частично в ней представлены и отечественные издания. Электронная библиотека имеет очень удобный интерфейс. Для доступа к ресурсам от пользователя требуется зарегистрироваться (но только с IP-адреса организации, входящей в консорциум пользователей электронной библиотеки) и запомнить свой логин и пароль. Для просмотра статей необходима программа Acrobat Reader (распространяется свободно).

Зарубежная текущая библиография

Зарубежная текущая библиография по естествознанию представлена в основном библиографическими и реферативными базами данных (БД). Большинство БД распространяются на компакт-дисках, к некоторым возможен доступ через Интернет. Наиболее распространенные и авторитетные БД по естествознанию и технике приведены ниже.

Current Contents (Institute for Scientific Information, USA) – электронный аналог одноименного печатного издания, включает оглавления ведущих научных журналов мира.

Science Citation Index (SCI) (Institute for Scientific Information, USA) – отражает статьи и сделанные в них ссылки более чем из 3400 лучших научных журналов 70 стран мира; благодаря РФФИ данная библиография доступна для всех академических институтов с сайта Электронной научной библиотеки (охватывает период с 1991 по 2003 г.) – <http://wos.elibrary.ru/wos/ciw.cgi/>.

CONFSCI (*Conference Papers Index*) (Cambridge Scientific Abstracts, USA) – библиографическое описание докладов на конференциях и симпозиумах.

PASCAL (*Programme Applique a le Selection et a la Compilation Automatique de la Literature*) (French National Research Council) – полнотекстовая БД по всем отраслям естествознания, отражает статьи из периодических и продолжающихся изданий, сборников, монографии, отчеты, материалы конференций, диссертации; формируется на английском и французском языках.

Biological Abstracts (BIOSIS) – информация о статьях из журналов по всем отраслям биологии.

MEDLINE (*Medical Literature Analysis and Retrieval System Online*) (National Library of Medicine) – статьи в области медицины, молекулярной биологии и биохимии из 4200 журналов.

Электронные информационные ресурсы

В сети Интернет представлены огромные массивы информации. Важно не утонуть в этом море и найти именно то, что вам необходимо. Используйте поисковые системы общего назначения:

Яндекс – русскоязычный Интернет: <http://www.yandex.ru/>;

Рамблер – русскоязычный Интернет: <http://www.rambler.ru/>;

Google – русско- и англоязычный Интернет: <http://www.google.com/>;

Yahoo – англоязычный Интернет: <http://www.yahoo.com/>;

AltaVista – англоязычный Интернет: <http://www.altavista.com/>.

Для поиска библиографической информации используйте поисковые системы специального назначения:

Scirus – поиск библиографии: <http://www.scirus.com/srsapp/>;

ISI – Институт научной информации (библиография, цитирование): <http://wos.elibrary.ru/wos/ciw.cgi/>.

Не забывайте, что эффективность поиска зависит от того, насколько правильно был сформулирован запрос и набраны ключевые слова. Во всех поисковых системах существует так называемый расширенный поиск с разветвленной логикой запросов (операторы AND, OR, NOT). Лучше потратить время на составление и отладку запроса, чем просматривать сотни случайно отобранных страниц.

Поиск можно начать со следующих мест в Интернете:

<http://vm.cfsan.fda.gov/~frf/biologic.html/>;

<http://biodiversty.uno.edu/>;

<http://vlib.org/>;

<http://media.lib.kth.se/ejournal/>.

Сайты крупных органов НТИ и библиотек России, Беларуси, на которых бывает открыт полнотекстовый доступ к российским и зарубежным журналам:

ВИНИТИ: [http://www.viniti.msk.ru/](http://www.viniti.msk.ru;);

Государственная публичная научно-техническая библиотека России (ГПНТБ России): <http://www.gpntb.ru/>;

Библиотека Российской академии наук: <http://www.csa.ru/>;

Российская национальная библиотека: <http://www.nlr.ru/>;

Библиотека по естественным наукам РАН: <http://www.benran.ru/>;

Государственная публичная научно-техническая библиотека Сибирского отделения Российской академии наук (ГПНТБ СО РАН): <http://www.spsl.nsc.ru/>;

Корпоративная сеть библиотек Урала – сводный электронный каталог: <http://consensus.eunnet.net/>;

Свердловская областная научная библиотека им. В. Г. Белинского: <http://book.uraic.ru/>;

Библиотека Конгресса США: <http://www.copyright.ru/loc/index.html/>;

Белорусская сельскохозяйственная библиотека: <http://belal.by/>;

Коллекция авторефератов Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь: <http://www.vak.org.by/library>.

СОДЕРЖАНИЕ

1. ОСНОВЫ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	3
1.1. Понятие о научном исследовании	3
1.2. Этапы научных исследований	4
1.2.1. Формулирование темы	4
1.2.2. Формулирование цели и задач исследования	7
1.2.3. Теоретические исследования	8
1.2.4. Экспериментальные исследования	9
1.2.5. Анализ и оформление научных исследований	11
1.2.6. Внедрение и эффективность научных исследований	12
2. ОРГАНИЗАЦИЯ РЫБОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В БЕЛАРУСИ И ЗА РУБЕЖОМ	13
2.1. Понятие об ученом	13
2.2. Ученая степень	14
2.2.1. Кандидат наук	16
2.2.2. Доктор наук	17
2.2.3. Известные доктора наук Беларуси в области рыбохозяйственных исследований	19
2.3. Отрасли науки	26
2.3.1. Ихтиология	29
2.3.2. Гидробиология	29
2.3.3. Биологические ресурсы	30
2.3.4. Рыбное хозяйство и аквакультура	31
2.4. Ученое звание	32
2.5. Организации Беларуси, осуществляющие рыбохозяйственные исследования. Национальная академия наук Беларуси	35
3. ПРАВИЛА ВЕДЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ ДОКУМЕНТАЦИИ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	37
4. ОСНОВЫ НАУЧНОЙ ЭТИКИ И БИОЭТИКИ	41
4.1. Основные принципы этики научного сообщества	41
4.2. Нарушение научной этики	41
4.3. Документирование исследований и хранение исходных материалов	42
4.4. Биоэтические правила проведения экспериментальных исследований и испытаний на рыбах	43
5. НАУЧНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ	46
5.1. Основные структурные элементы статьи и рекомендации по их написанию	49
5.2. Правила написания научной статьи (журнал «Вопросы ихтиологии»)	53
5.3. Графическое и цифровое представление результатов научных исследований	57
6. ОРГАНИЗАЦИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ В РЫБОВОДСТВЕ	69
6.1. Правила подбора рыб для эксперимента	69
6.2. Характеристика периодов эксперимента	69
6.3. Классификация методов исследований в рыбоводстве. Сущность методов	70
7. МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОКРАСКИ РЫБ	78
8. МЕТОДЫ ГИДРОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ	86
8.1. Правила отбора проб воды	86
8.2. Определение физических свойств воды (температура, прозрачность, цвет, запах, вкус)	87
8.3. Особенности выполнения анализа колориметрическими (спектрометрическими) методами	90

8.3.1. Определение массовой концентрации аммиака и ионов аммония (суммарно)	91
8.3.2. Определение массовой концентрации нитритов	101
8.3.3. Определение массовой концентрации нитратов	106
8.4. Особенности выполнения анализа титриметрическим методом	111
8.5. Приборы для экспресс-анализа и полевых исследований	113
9. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КРОВИ РЫБ	115
9.1. Общие требования к работе с кровью рыб	115
9.2. Отбор проб крови	115
9.3. Гормональные исследования. ИФА-анализ	121
9.4. Биохимические исследования	125
9.4.1. Гематологические исследования	131
9.4.2. Результаты биохимических исследований разных видов рыб	144
10. МЕТОДЫ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ. БИОТЕСТИРОВАНИЕ	149
10.1. Условия выполнения биотестирования	151
10.2. Общие принципы и схема проведения биотестирования	151
10.3. Методика биотестирования с использованием тест-культуры рыб гуппи (<i>Poecilia reticulata</i>)	159
10.4. Методика приготовления восстановленной воды	160
10.5. Графический способ установления медианной эффективной (летальной) концентрации токсического вещества (смеси веществ) и среднего эффективного (летального) разбавления воды	161
10.6. Отчетность	163
10.7. Категории острой токсичности согласно СГС	164
10.8. Протокол содержания лабораторной культуры рыб гуппи (<i>Poecilia reticulata</i> Peters)	165
11. ЭКОЛОГО-МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И ЭТОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКА ЖИЗНЕСТОЙКОСТИ ЛИЧИНОК И МОЛОДИ	168
11.1. Прижизненные методы оценки – экспресс-тесты	169
11.2. Анафазный метод учета хромосомных aberrаций у предличинок	172
11.3. Оценка физиологического состояния личинок осетровых по «фоновым» реакциям пигментных клеток (меланофоров)	173
11.4. Тератологический анализ личинок и молоди	175
11.5. Оценка адаптационных качеств молоди по реакциям центральной нервной системы	176
11.6. Нейрофармакологическое тестирование	179
11.7. Изучение поведенческих реакций молоди осетра на запечатленный химический стимул	180
11.8. Методы функциональных нагрузок	186
12. РАЗМЕРНО-ВЕСОВЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ	188
12.1. Исследование роста рыбы в рыбоводстве	188
12.2. Схемы измерения рыб разных семейств	190
13. ПОИСК НАУЧНОЙ ИНФОРМАЦИИ	198

Учебное издание

Барулин Николай Валерьевич
Жарикова Анастасия Олеговна
Шумский Константин Леонардович

МЕТОДЫ РЫБОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Учебно-методическое пособие

Редактор *Н. Н. Пьянусова*
Технический редактор *Н. Л. Якубовская*
Корректор *Н. П. Лаходанова*

Подписано в печать 08.12.2022. Формат 60×84 ¹/₁₆. Бумага офсетная.
Ризография. Гарнитура «Таймс». Усл. печ. л. 11,86. Уч.-изд. л. 10,23.
Тираж 40 экз. Заказ .

УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия».
Свидетельство о ГРИИРПИ № 1/52 от 09.10.2013.
Ул. Мичурина, 13, 213407, г. Горки.

Отпечатано в УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия».
Ул. Мичурина, 5, 213407, г. Горки.