

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ И КАДРОВ

Учреждение образования  
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ  
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»

**РЕКОМЕНДАЦИИ  
ПО ВОСПРОИЗВОДСТВУ  
ОСЕТРОВЫХ РЫБ В РЫБОВОДНЫХ  
ИНДУСТРИАЛЬНЫХ КОМПЛЕКСАХ  
С ПРИМЕНЕНИЕМ ИННОВАЦИОННЫХ  
МЕТОДОВ**

*Для специалистов в области рыбного хозяйства и аквакультуры,  
аспирантов, магистрантов, студентов вузов,  
слушателей института повышения квалификации  
и переподготовки кадров*

Горки  
БГСХА  
2016

УДК 639.3:001.895

ББК 47.2

Р36

*Рекомендовано Научно-техническим советом БГСХА.*

*Протокол № 1 от 5 января 2016 г.*

Авторы:

кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *Н. В. Барулин*;  
кандидат физико-математических наук *В. Ю. Плавский*;  
магистры сельскохозяйственных наук *К. Л. Шумский*,  
*Л. О. Атрощенко*, *Е. Г. Новикова*;  
аспиранты *С. В. Роговцов*, *М. С. Лиман*

Рецензенты:

доктор сельскохозяйственных наук, профессор *Н. А. Садовов*;  
кандидат биологических наук, доцент *В. Г. Костоусов*

**Рекомендации по воспроизводству осетровых рыб в рыбоводных индустриальных комплексах с применением инновационных методов** / Н. В. Барулин [и др.]. – Горки : БГСХА, 2016. – 204 с.

Изложены основные современные технологические операции и техническое обеспечение, применяемые при воспроизводстве и выращивании осетровых рыб в условиях замкнутого водоснабжения в рыбоводных индустриальных комплексах.

Для специалистов в области рыбного хозяйства и аквакультуры, аспирантов, магистрантов, студентов вузов, слушателей института повышения квалификации и переподготовки кадров.

**УДК 639.3:001.895**

**ББК 47.2**

© УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия», 2016

## ВВЕДЕНИЕ

Потребление рыбы и продуктов ее переработки является важным показателем уровня и качества жизни населения. Потребность в этих продуктах удовлетворяется рыбохозяйственным комплексом, представляющим собой сложный многоотраслевой производственный механизм. В условиях когда уловы океанической рыбы и других морепродуктов сокращаются, а рыбные запасы внутренних водоемов находятся в критическом состоянии и поддерживаются в основном за счет искусственного воспроизводства, единственным надежным источником увеличения объемов пищевой рыбопродукции является аквакультура – культивирование рыб, других водных животных и растений в контролируемых и управляемых человеком условиях. По данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (FAO), производство рыбы и морепродуктов в условиях аквакультуры к 2030 г. достигнет 83 млн. т в год.

Установки замкнутого водоснабжения (УЗВ) позволяют осуществлять круглогодичное выращивание любых видов аквакультуры вне зависимости от климатических условий при одновременном достижении максимальных показателей роста и продуктивности на фоне сбережения ресурсов и обеспечения экологической чистоты производственного процесса.

Аквакультуру Беларуси можно разделить на прудовую, садковую, как в водоемах-охладителях электростанций, так и в естественных условиях, установки замкнутого водоснабжения и пастбищное рыбоводство в естественных водоемах.

В последние годы в Беларуси активно развивается аквакультура в УЗВ. В рамках Государственных программ, а также с привлечением частных и иностранных инвестиций начиная с 1998 г. было реализовано более 13 проектов по созданию рыбоводных промышленных комплексов на базе УЗВ по выращиванию таких рыб, как осетровые (ЧПУП «Акватория» фермерского хозяйства «Василек» Дзержинского района; КСПА «Несвижская» Несвижского района; ООО ТМ г. Минска; ООО «Ремона» г. Могилева; СП «Санта Бремор» ООО г. Бреста), клариевые (ИООО «Ясельда» Березовского района), лососевые (УО БГСХА г. Горки; КПУП «Форелевое хозяйство «Лохва» Быховского района; форелевое хозяйство Костюковичского района; ОАО «ПМК-83 Водстрой» Бельничского района; «Рыбопитомник «Бо-

гушевский» УП «Лиозненское ПМС» Лиозненского района; ОАО «Рыбхоз «Альба» Несвижского района); угревые (фермерское хозяйство «Актам Фиш» Миорского района) и др.

Установки замкнутого водоснабжения позволяют повысить уровень интенсификации технологии воспроизводства большинства объектов аквакультуры, особенно ценных видов, однако дальнейшее его повышение сталкивается с необходимостью системного подхода к освоению и внедрению новых инновационных технологий.

На современном этапе развития аквакультуры необходимо делать разграничения в технологии выращивания одного и того же вида в зависимости от конечных целей. Например, при выращивании осетровых в условиях аквакультуры имеются три основных направления: выращивание посадочного материала для зарыбления естественных водоемов; товарное выращивание; выращивание рыбы с целью воспроизводства (получения посадочного материала или пищевой икры). Каждое из указанных направлений имеет отличительные особенности, без учета которых результативные показатели будут значительно снижены.

Воспроизводство ценных видов рыб – это сложный технологический процесс, включающий в себя работу с производителями, получение посадочного материала, формирование ремонтного и маточного стада. Каждый этап данного технологического процесса влияет на успех следующего этапа и в целом всей технологии воспроизводства: успех получения жизнестойкого посадочного материала зависит от продуктивности, здоровья и качества производителей из маточного стада; полноценное ремонтное стадо формируется из посадочного материала, который должен выращиваться по другой, отличной от товарного выращивания, технологии; продуктивность рабочего маточного стада зависит от эффективности отбора и качества ремонтного стада. Каждый из названных элементов, в свою очередь, зависит от условий и технологии выращивания.

Для повышения эффективности каждого этапа процесса воспроизводства необходимо не только строго выполнять весь технологический цикл, но и внедрять систему новых инновационных методов.

# **1. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ФОРМИРОВАНИЮ РЕМОНТНО-МАТОЧНЫХ СТАД ДЛЯ ИКОРНОГО ОСЕТРОВОДСТВА С ПРИМЕНЕНИЕМ БИОХИМИЧЕСКИХ, ГОРМОНАЛЬНЫХ И УЛЬТРАЗВУКОВЫХ МЕТОДОВ**

## **1.1. Методика проведения исследований**

Отбор крови осуществлялся прижизненно из хвостовой вены с соблюдением ветеринарно-санитарных правил и принципов гуманного отношения к животным.

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

Кровь отбирается в утреннее время, до кормления. Процесс отбора крови должен быть максимально безболезненным и быстрым (не более 30 с). Кровь отбирается в чистые, сухие пробирки. Для биохимических исследований отбирается венозная кровь в объеме 3 мл. Полученный материал сразу же закрывается пробками, чтобы не допустить контакта с внешней средой. Для получения сыворотки крови антикоагулянт не добавляется. Ее получают после свертывания крови при температуре 18–20 °С с последующим охлаждением при температуре 4 °С и цен-

трифугированием в течение 15 мин при 3000 об/мин на лабораторной центрифуге.

В полученной сыворотке крови определяется активность  $\alpha$ -гидроксибутиратдегидрогеназы (LDH-1),  $\gamma$ -глутамилтрансферазы (GGT), лактатдегидрогеназы (LD), аспаратаминотрансферазы (AST), щелочной фосфатазы (ALP), аланинаминотрансферазы (ALT), концентрация полного белка (TP), альбумина (Alb), холестерина (Chol), неорганического фосфора (Phosphorus), лактатдегидрогеназы (LDH), триглицеридов (TG), кальция (Ca), мочевой кислоты (UA). Все исследования проводились при температуре 25 °С с использованием реактивов фирмы Sigma.

При проведении иммуноферментного анализа в полученной сыворотке крови определяют концентрации следующих гормонов: лютеинизирующий гормон (ЛГ), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), хорионический гонадотропин (ХГ), прогестерон, эстрадиол, тестостерон, дегидроэпиандростерон (ДЭАС), кортизол.

Для проведения УЗИ-диагностики рыб используют сканер Mindray DP-6600 (или любой другой ветеринарный сканер, обладающий необходимыми характеристиками), который оснащен линейным датчиком с размерами рабочей поверхности 40–60 мм и рабочей частотой 5–10 МГц. Для четкой визуализации гонад рыб необходимо, чтобы минимальный линейный размер гонад на гистологическом срезе превышал длину ультразвуковой волны минимум в 10–20 раз, в противном случае границы органов будут нечеткими или не будут видны. Отражение большей части звуковых волн происходит в направлении источника звука. Поэтому для получения четкого изображения ультразвуковой пучок направляется к исследуемому органу под углом 90°, обеспечивающим максимальное отражение и последующую визуализацию.

Ультразвуковое экспресс-исследование гонад осетровых рыб проводится во фронтальной (продольной) или поперечной плоскостях. При проведении диагностики датчик плотно прижимается к поверхности тела в районе 3–4-й брюшных жучек так, чтобы один край датчика находился прямо над жучками. Периодическими наклонами датчика влево-вправо определяется оптимальный продольный разрез. Далее датчик медленно перемещается в выбранной плоскости в направлении головы.

## 1.2. Исследование активности аспаратаминотрансферазы (AST) ремонтно-маточного стада осетровых рыб

Установлено, что активность AST в сыворотке крови ремонтно-маточных стад (PMC) и производителей осетровых зависит от различного физиологического состояния рыб.

Так, активность AST (рис. 1) у нормально созревающих ремонтно-маточных стад осетровых была на 97,0 % выше, чем у несозревающих или тугосозревающих ( $P = 0,0000001$ ).

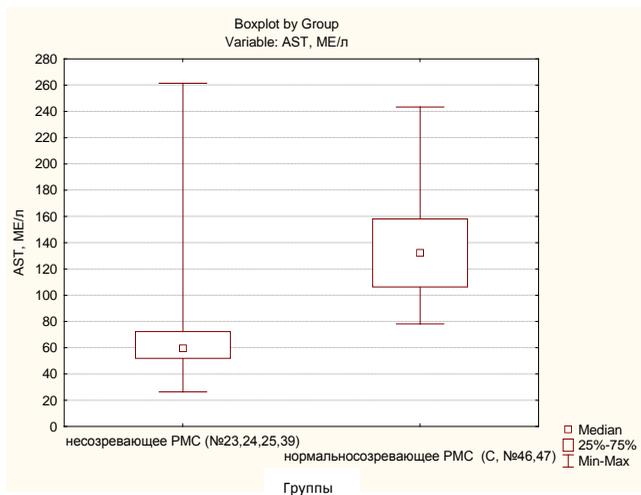


Рис. 1. Сравнение активности AST между несозревающим и нормально созревающим ремонтно-маточными стадами осетровых (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,0000001$ )

Активность AST (рис. 2) у самок осетровых рыб, отрицательно ответивших на стимулирующую инъекцию во время нереста, была в среднем на 46,7 % выше активности AST самок осетровых рыб, положительно ответивших на данную инъекцию ( $P = 0,006776$ ). Эти различия зависели от вида осетровых рыб: у самок бестера (рис. 3), отрицательно ответивших на стимулирующую инъекцию во время нереста, активность AST была на 82,8 % выше ( $P = 0,016704$ ) по сравнению с самками, положительно ответившими на данную инъекцию; у самок ленского осетра (рис. 4) – на 92,8 % выше ( $P = 0,008151$ ).

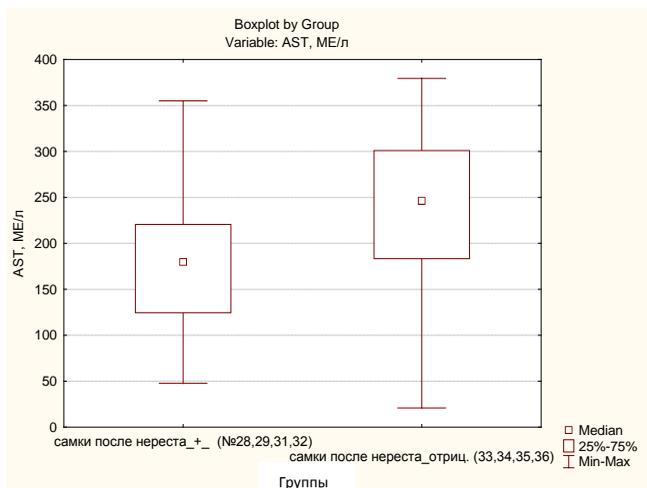


Рис. 2. Сравнение активности AST между самками осетровых, положительно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста, и самками осетровых, отрицательно ответившими на данную инъекцию (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,006776$ )

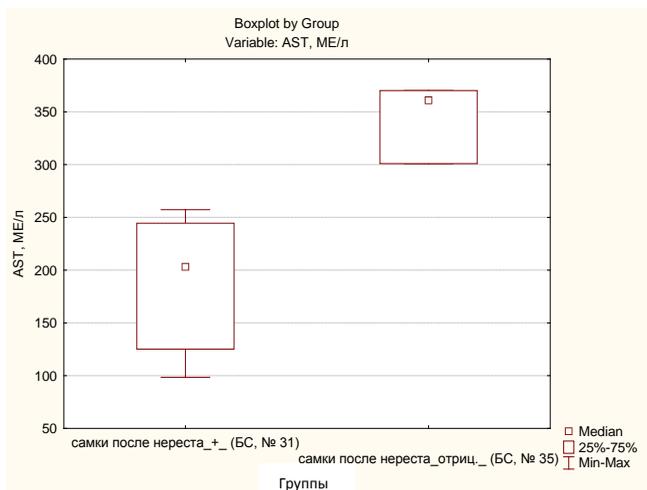


Рис. 3. Сравнение активности AST между самками гибрида бестера, положительно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста, и самками гибрида бестера, отрицательно ответившими на данную инъекцию (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,016704$ )

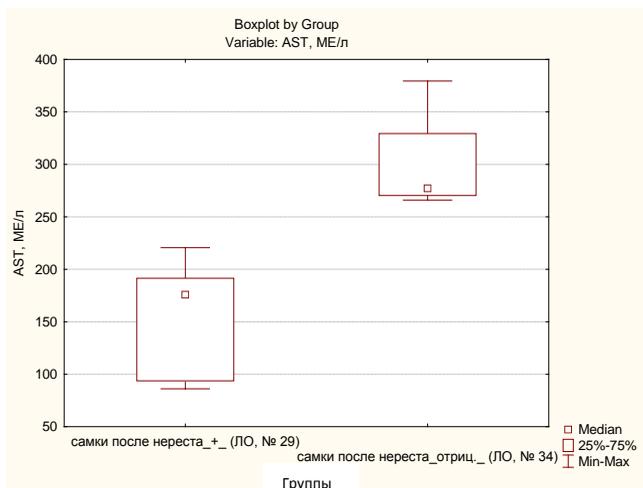


Рис. 4. Сравнение активности AST между самками ленского осетра, положительно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста, и самками ленского осетра, отрицательно ответившими на данную инъекцию (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,008151$ )

Нами установлены достоверные различия в активности AST между ремонтно-маточными стадами во время осенней бонитировки и производителей после нереста. Так, активность AST (рис. 5) у производителей осетровых рыб после нереста была выше в среднем на 56,0 %, чем у нормально созревающего РМС ( $P = 0,001985$ ), и на 213,2 % (рис. 6) выше, чем у ненормально созревающего РМС ( $P = 0,001985$ ). Эти различия зависели от реакции ответа на стимулирующую инъекцию (рис. 7–10), а также имели видовые особенности (рис. 11–16).

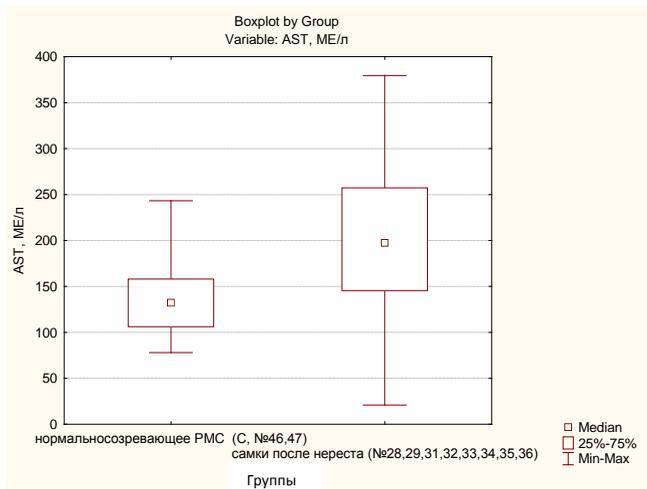


Рис. 5. Сравнение активности AST между нормально созревающим ремонтно-маточным стадом осетровых и самками осетровых после нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,001985$ )

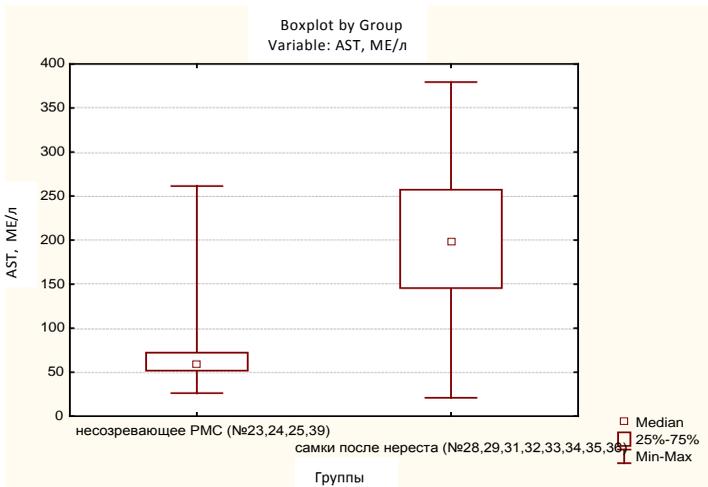


Рис. 6. Сравнение активности AST между незревающим ремонтно-маточным стадом осетровых и самками осетровых после нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,0000001$ )

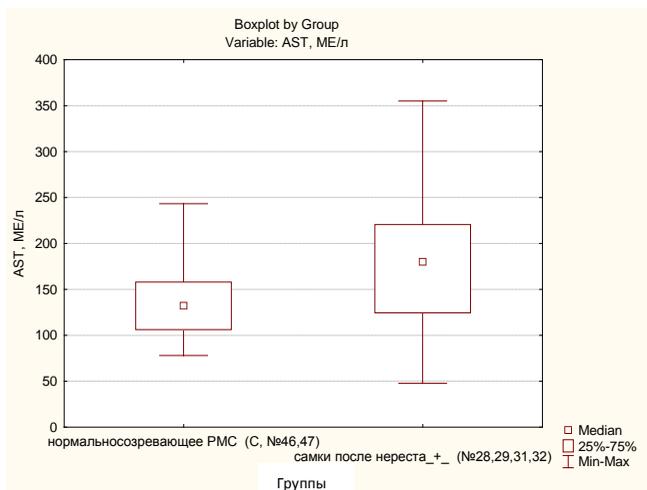


Рис. 7. Сравнение активности AST между нормально созревающим ремонтно-маточным стадом осетровых и самками осетровых, положительно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,041052$ )

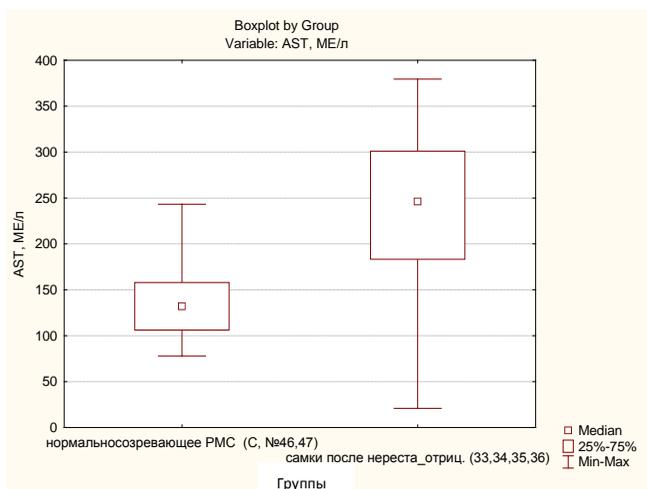


Рис. 8. Сравнение активности AST между нормально созревающим ремонтно-маточным стадом осетровых и самками осетровых, отрицательно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,000184$ ).

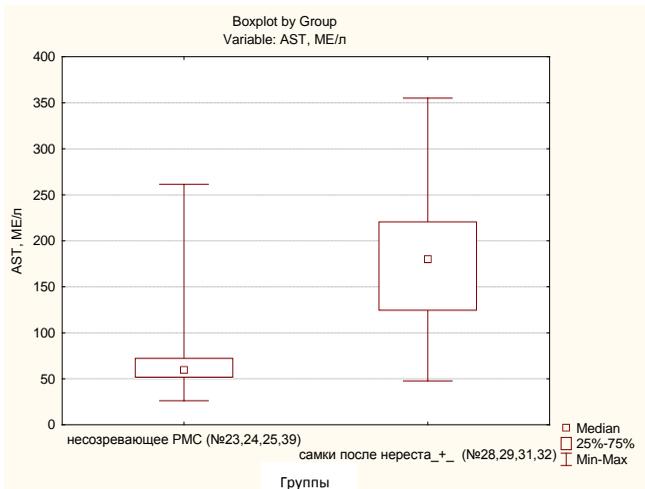


Рис. 9. Сравнение активности AST между незрелым ремонтно-маточным стадом осетровых и самками осетровых, положительно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,0000001$ )

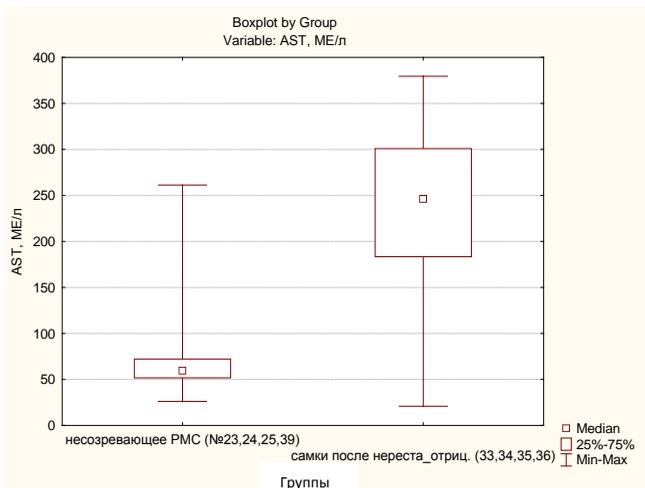


Рис. 10. Сравнение активности AST между незрелым ремонтно-маточным стадом осетровых и самками осетровых, отрицательно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,0000001$ )

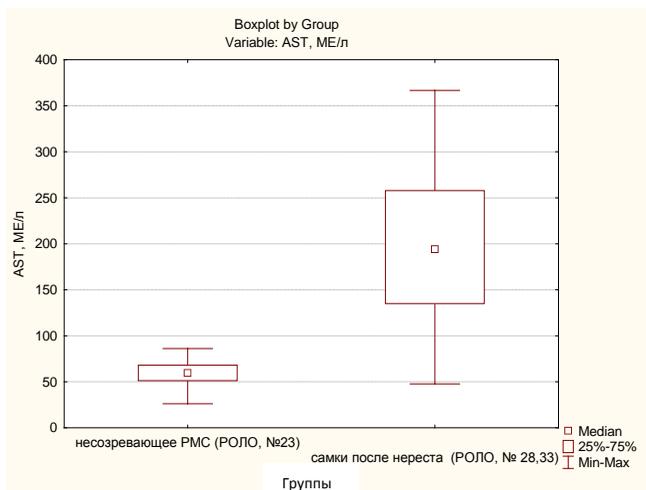


Рис. 11. Сравнение активности AST между незрелым ремонтно-маточным стадом гибрида РОЛО и самками гибрида РОЛО после нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,0000001$ )

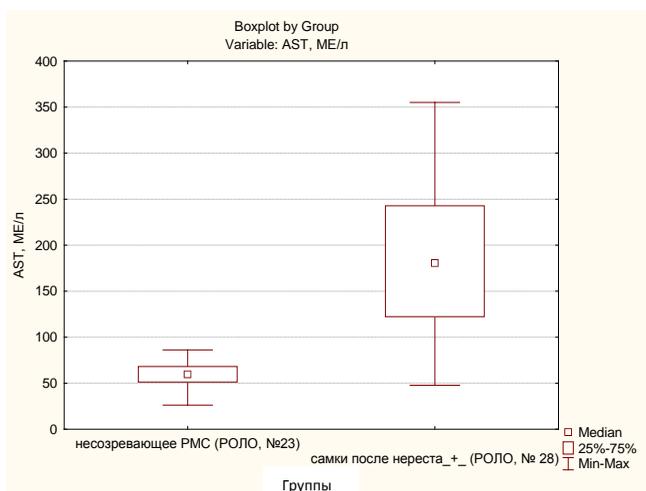


Рис. 12. Сравнение активности AST между незрелым ремонтно-маточным стадом гибрида РОЛО и самками гибрида РОЛО, положительно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,0000005$ )

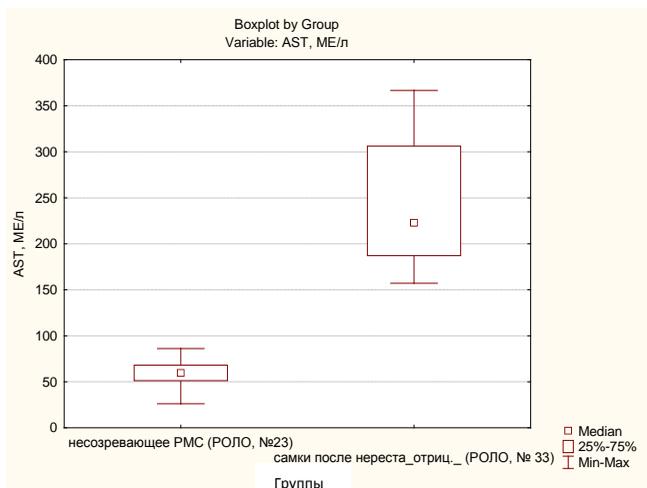


Рис. 13. Сравнение активности AST между незрелым ремонтно-маточным стадом гибрида РОЛО и самками гибрида РОЛО, отрицательно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,000020$ )

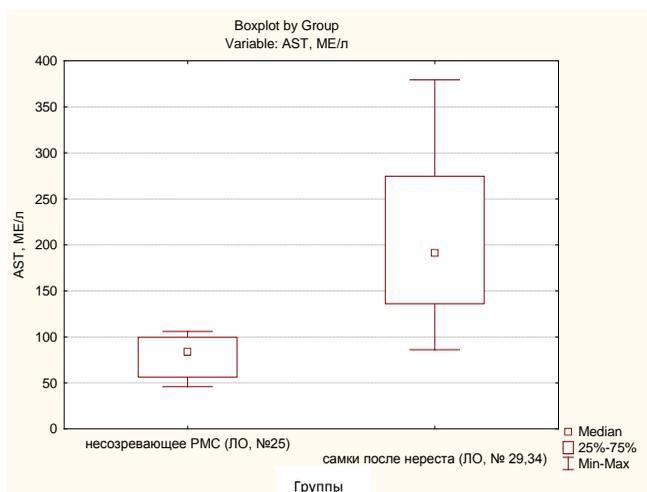


Рис. 14. Сравнение активности AST между незрелым ремонтно-маточным стадом ленского осетра и самками ленского осетра после нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,002414$ )

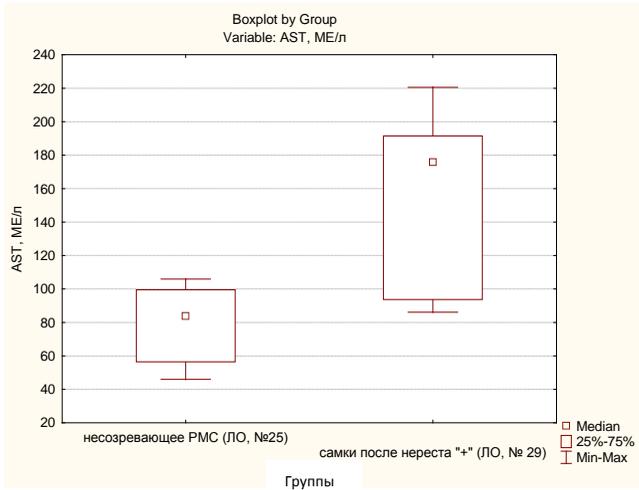


Рис. 15. Сравнение активности AST между незрелым ремонтно-маточным стадом ленского осетра и самками ленского осетра, положительно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,012717$ )

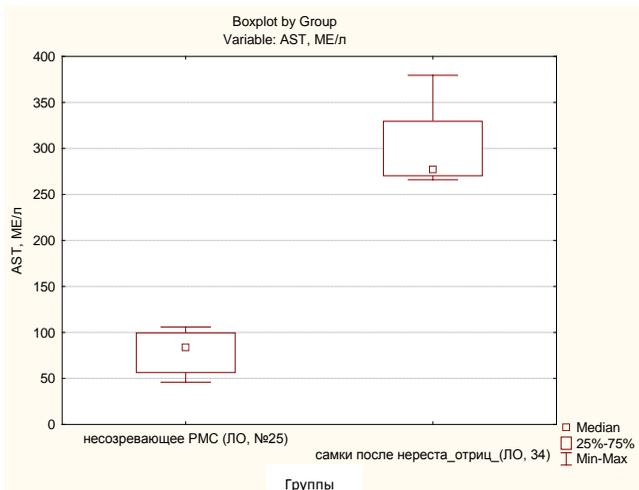


Рис. 16. Сравнение активности AST между незрелым ремонтно-маточным стадом ленского осетра и самками ленского осетра, отрицательно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,008151$ )

### 1.3. Исследование активности аланинаминотрансферазы (ALT) ремонтно-маточного стада осетровых рыб

Установлено, что активность ALT в сыворотке крови ремонтно-маточных стад и производителей осетровых зависит от различного физиологического состояния рыб.

Активность ALT (рис. 17) у самок ленского осетра, отрицательно ответивших на стимулирующую инъекцию во время нереста, была в среднем на 70,5 % выше активности ALT самок ленского осетра, положительно ответивших на стимулирующую инъекцию во время нереста ( $P = 0,037636$ ).

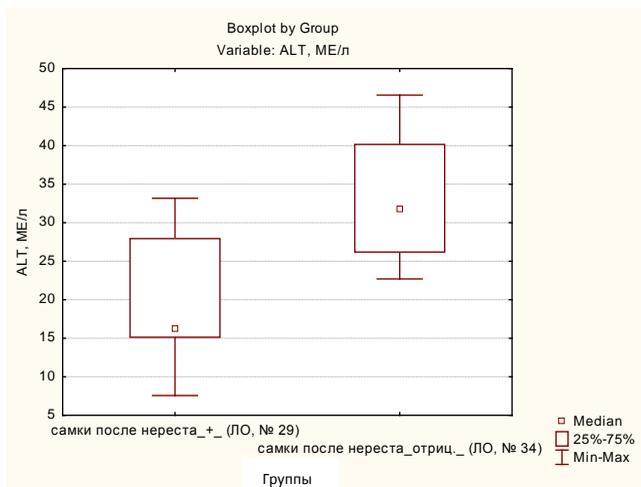


Рис. 17. Сравнение активности ALT между самками ленского осетра, положительно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста, и самками ленского осетра, отрицательно ответившими на данную инъекцию (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,037636$ )

Нами установлены достоверные различия в активности ALT между ремонтно-маточными стадами во время осенней бонитировки и производителями после нереста. Так, активность ALT (рис. 18) у производителей осетровых рыб после нереста была выше в среднем на 120,2 %, чем у нормально созревающего РМС ( $P = 0,000724$ ), и на 35,5 % выше (рис. 19), чем у ненормально созревающего РМС ( $P = 0,0000001$ ). Эти различия зависели от реакции ответа на стимулирующую инъекцию, а также имели видовые особенности (рис. 20–25).

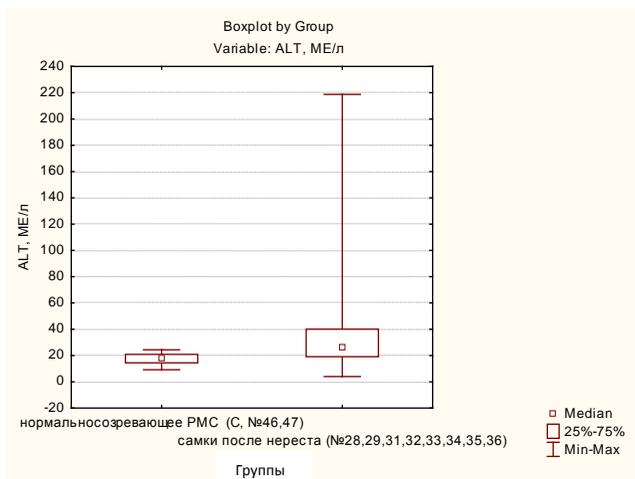


Рис. 18. Сравнение активности ALT между нормально созревающим ремонтно-маточным стадом осетровых и самками осетровых после нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,000724$ )

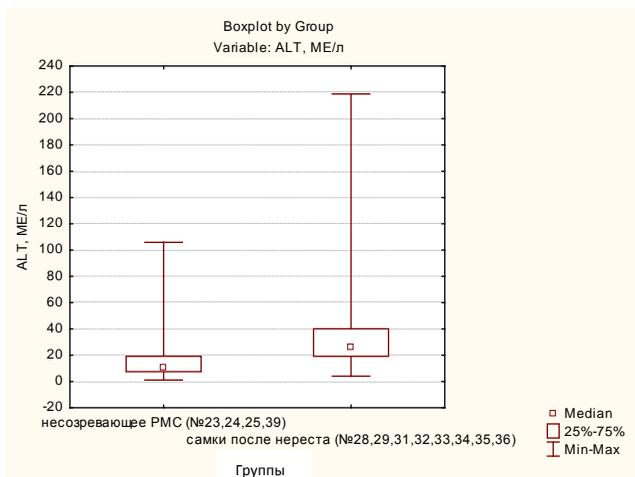


Рис. 19. Сравнение активности ALT между несозревающим ремонтно-маточным стадом осетровых и самками осетровых после нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,0000001$ )

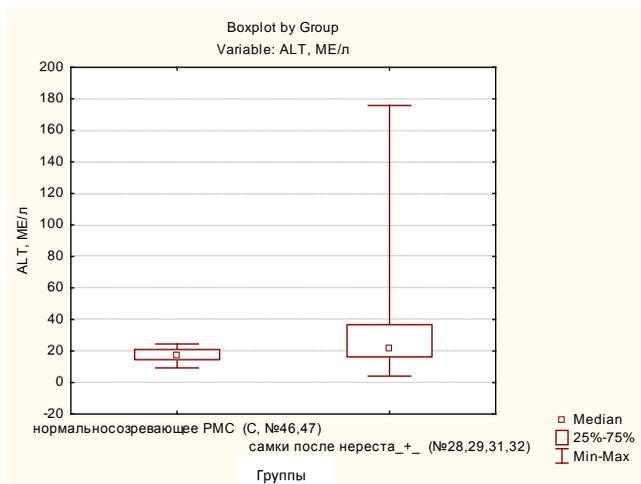


Рис. 20. Сравнение активности ALT между нормально созревающим ремонтно-маточным стадом осетровых и самками осетровых, положительно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,024765$ )

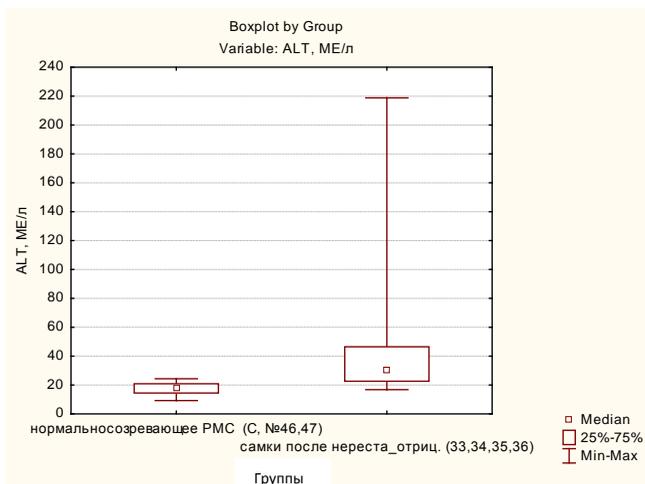


Рис. 21. Сравнение активности ALT между нормально созревающим ремонтно-маточным стадом осетровых и самками осетровых, отрицательно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,000070$ )

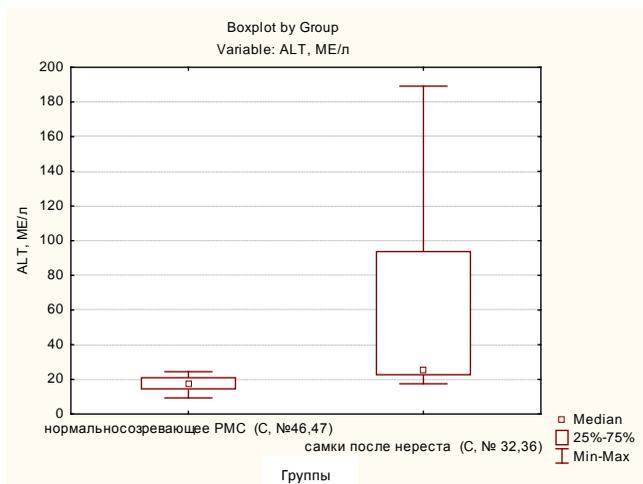


Рис. 22. Сравнение активности ALT между нормально созревающим ремонтно-маточным стадом стерляди и самками стерляди после нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,000818$ )

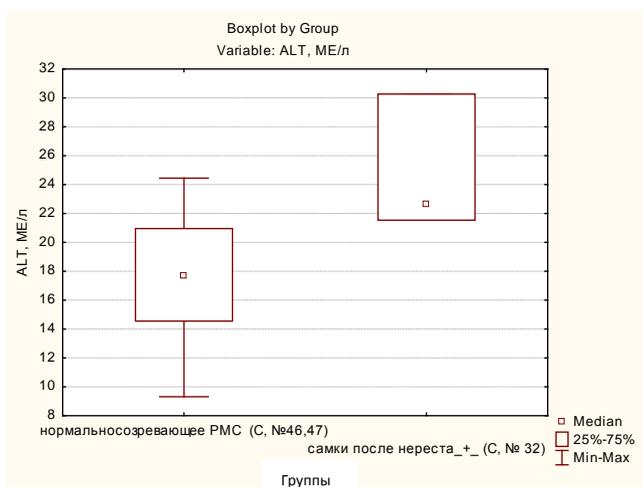


Рис. 23. Сравнение активности ALT между нормально созревающим ремонтно-маточным стадом стерляди и самками стерляди, положительно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,038607$ )

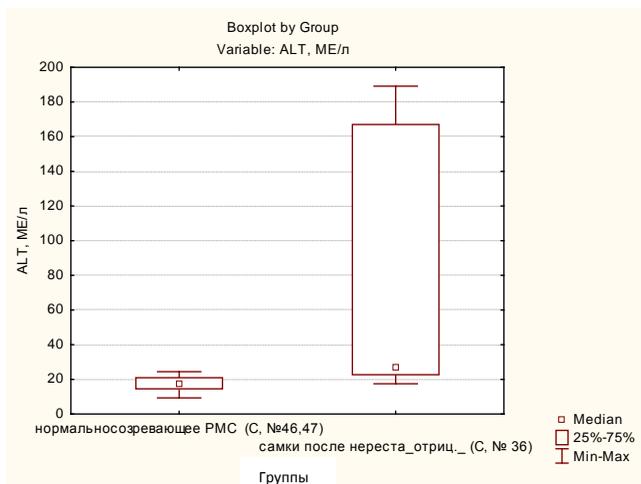


Рис. 24. Сравнение активности ALT между нормально созревающим ремонтно-маточным стадом стерляди и самками стерляди, отрицательно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,002641$ )

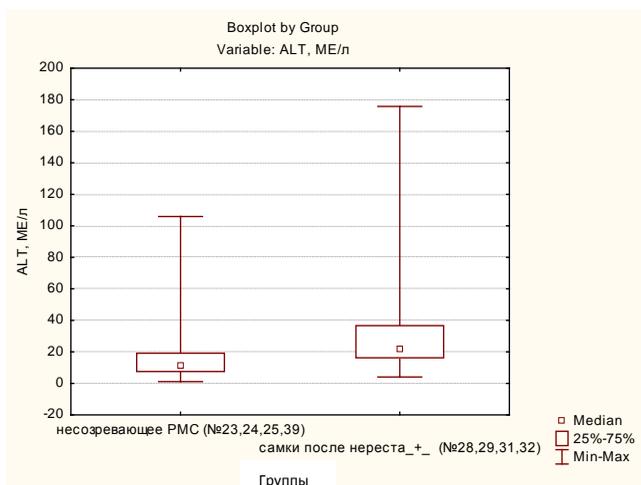


Рис. 25. Сравнение активности ALT между несозревающим ремонтно-маточным стадом осетровых и самками осетровых, положительно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,000405$ )

#### 1.4. Исследование активности щелочной фосфатазы (ALP) ремонтно-маточного стада осетровых рыб

Установлено, что активность ALP в сыворотке крови ремонтно-маточных стад и производителей осетровых зависит от различного физиологического состояния рыб.

Так, активность ALP (рис. 26) у незрелых (тугосозревающих) ремонтно-маточных стад осетровых на 134,8 % выше, чем у нормально созревающих ( $P = 0,0000001$ ).

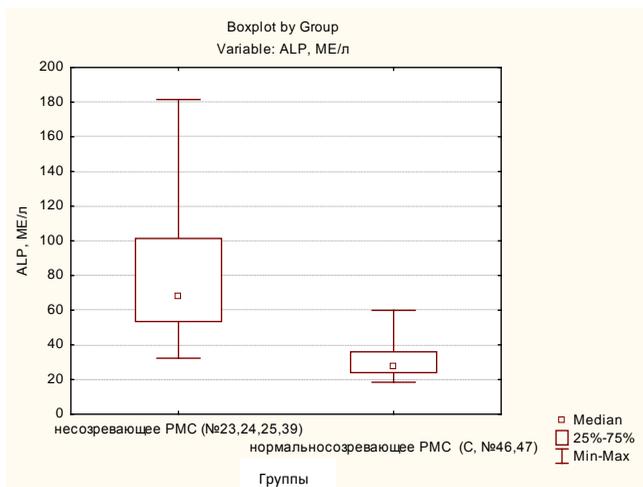


Рис. 26. Сравнение активности ALP между незрелым и нормально созревающим ремонтно-маточными стадами осетровых (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,0000001$ )

Активность ALP (рис. 27) у самок осетровых рыб, отрицательно ответивших на стимулирующую инъекцию во время нереста, была в среднем на 40,2 % выше активности ALP самок осетровых рыб, положительно ответивших на данную инъекцию ( $P = 0,002559$ ). Эти различия зависели от вида осетровых рыб: у рыб гибрида РОЛО (рис. 28), отрицательно ответивших на стимулирующую инъекцию во время нереста, активность ALP была на 88,1 % выше ( $P = 0,005137$ ), чем у рыб, положительно ответивших на данную инъекцию.

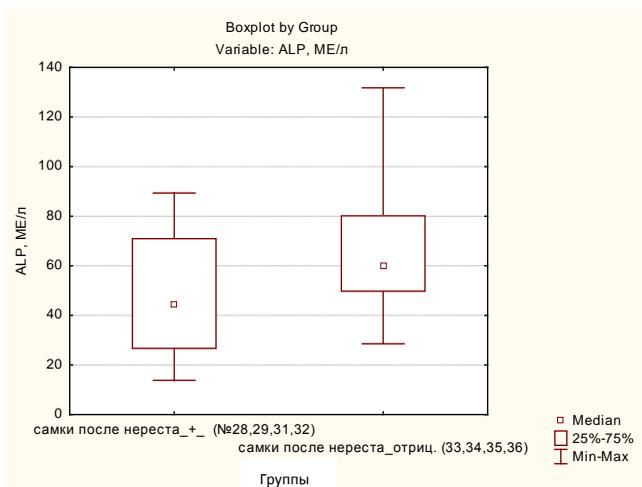


Рис. 27. Сравнение активности ALP между самками осетровых, положительно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста, и самками осетровых, отрицательно ответившими на данную инъекцию (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,002559$ )

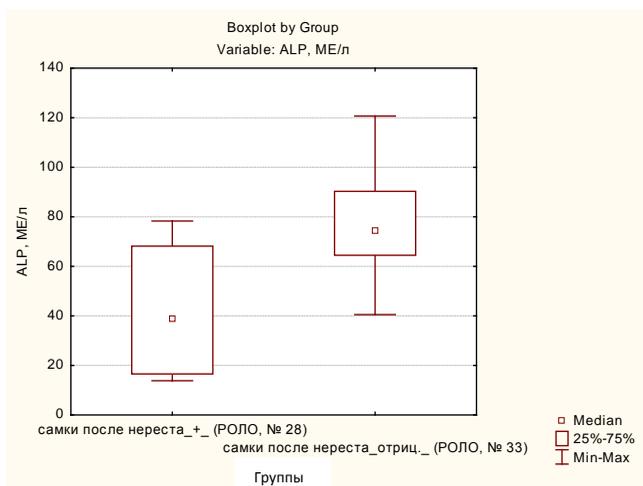


Рис. 28. Сравнение активности ALP между самками гибрида РОЛО, положительно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста, и самками гибрида РОЛО, отрицательно ответившими на данную инъекцию (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,005137$ )

Нами установлены достоверные различия в активности ALP между ремонтно-маточными стадами во время осенней бонитировки и производителями после нереста. Так, активность ALP (рис. 29) у производителей осетровых рыб после нереста была выше в среднем на 89,1 %, чем у нормально созревающего РМС ( $P = 0,000110$ ). Активность ALP у ненормально созревающего РМС была на 24,1 % выше активности ALP производителей осетровых рыб после нереста ( $P = 0,002443$ ). Эти различия зависели от реакции ответа на стимулирующую инъекцию, а также имели видовые особенности (рис. 30–41).

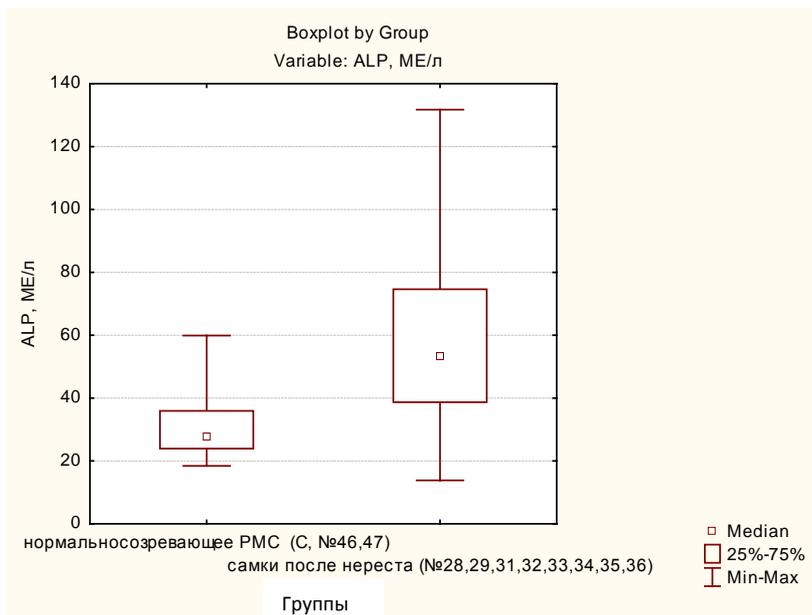


Рис. 29. Сравнение активности ALP между нормально созревающим ремонтно-маточным стадом осетровых и самками осетровых после нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,000110$ )

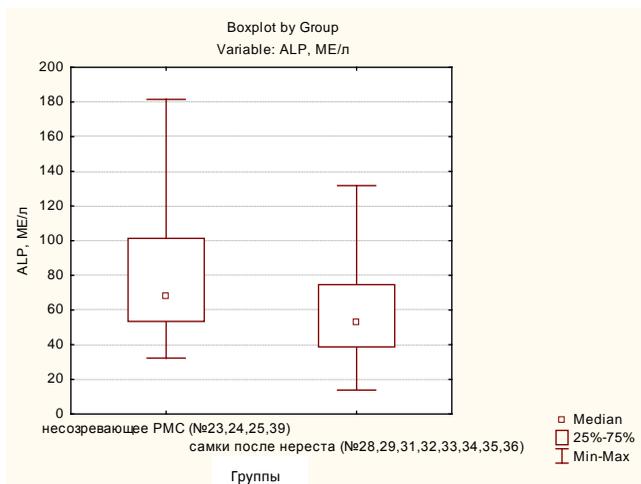


Рис. 30. Сравнение активности ALP между несозревающим ремонтно-маточным стадом осетровых и самками осетровых после нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,002443$ )

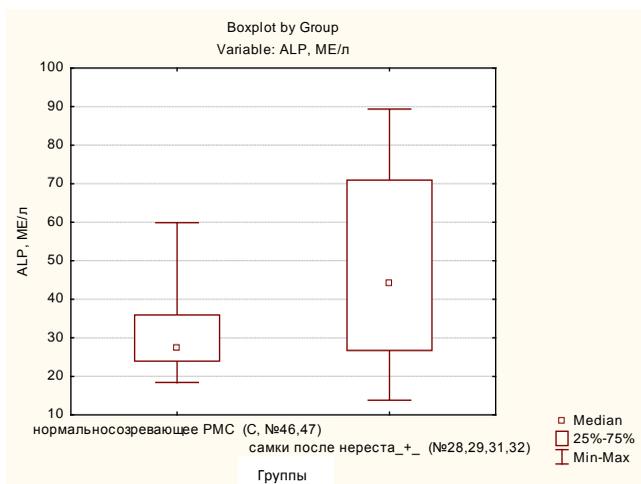


Рис. 31. Сравнение активности ALP между нормально созревающим ремонтно-маточным стадом осетровых и самками осетровых, положительно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,024765$ )

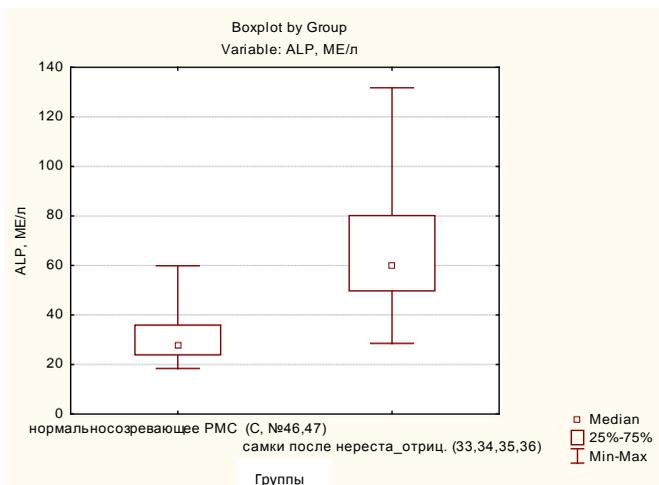


Рис. 32. Сравнение активности ALP между нормально созревающим ремонтно-маточным стадом осетровых и самками осетровых, отрицательно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,000001$ )

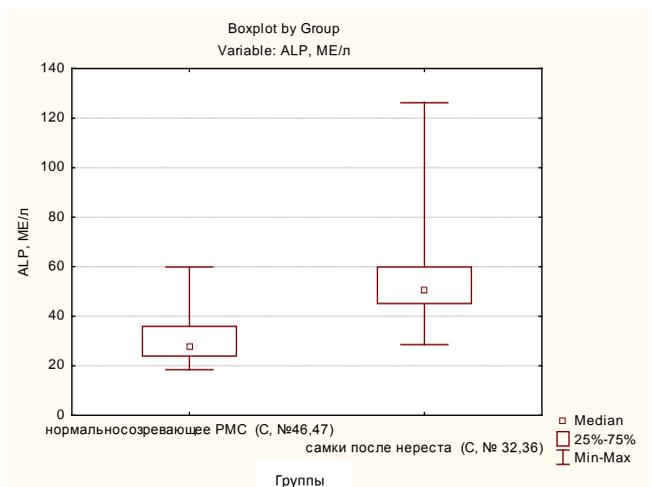


Рис. 33. Сравнение активности ALP между нормально созревающим ремонтно-маточным стадом стерляди и самками стерляди после нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,001430$ )

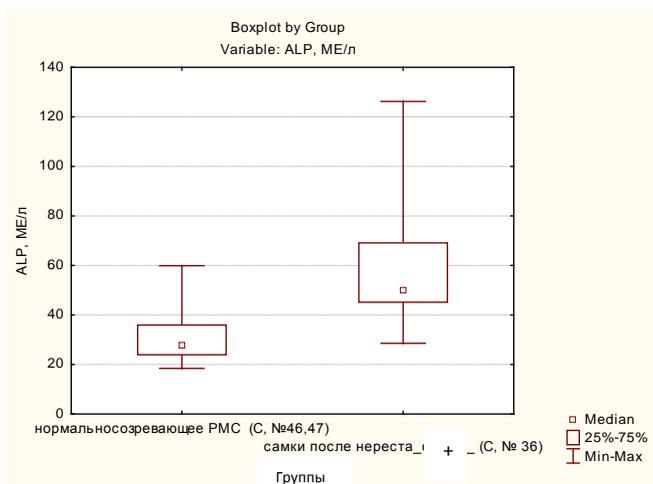


Рис. 34. Сравнение активности ALP между нормально созревающим ремонтно-маточным стадом стерляди и самками стерляди, положительно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,002641$ )

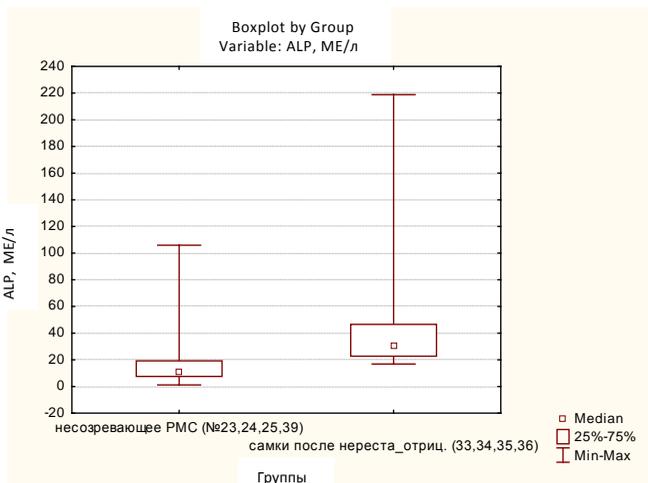


Рис. 35. Сравнение активности ALP между несозревающим ремонтно-маточным стадом осетровых и самками осетровых, отрицательно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,0000001$ )

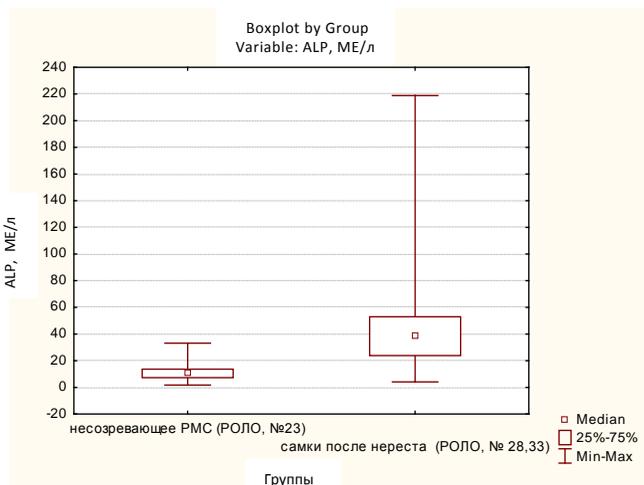


Рис. 36. Сравнение активности ALP между незрелым ремонтно-маточным стадом гибрида РОЛО и самками гибрида РОЛО после нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,000003$ )

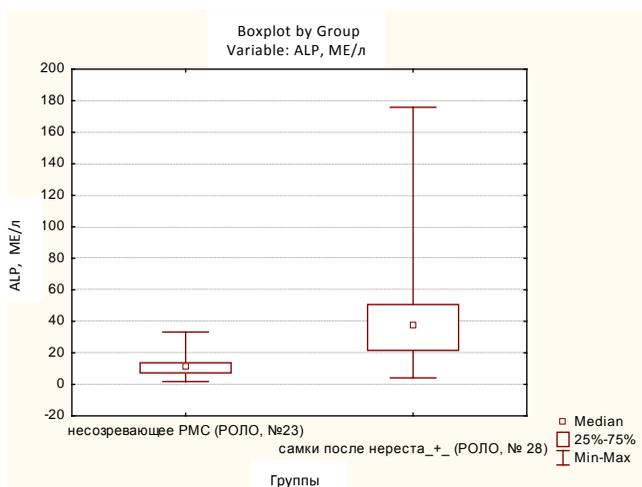


Рис. 37. Сравнение активности ALP между незрелым ремонтно-маточным стадом гибрида РОЛО и самками гибрида РОЛО, положительно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,000257$ )

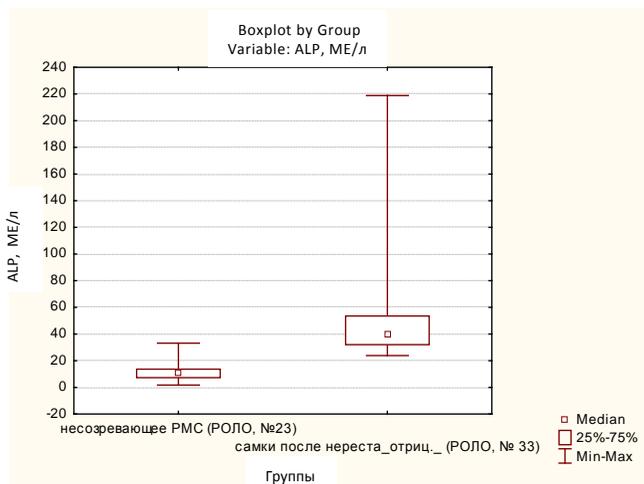


Рис. 38. Сравнение активности ALP между незрелым ремонтно-маточным стадом гибрида РОЛО и самками гибрида РОЛО, отрицательно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,0000089$ )

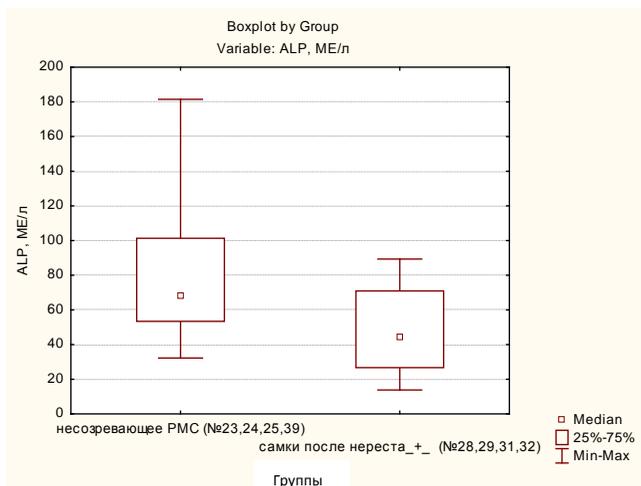


Рис. 39. Сравнение активности ALP между незрелым ремонтно-маточным стадом осетровых и самками осетровых, положительно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,000061$ )

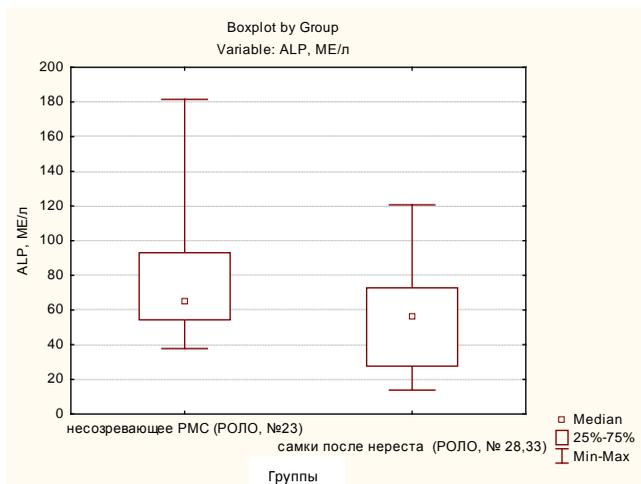


Рис. 40. Сравнение активности ALP между незрелым ремонтно-маточным стадом гибрида РОЛО и самками гибрида РОЛО после нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,027734$ )

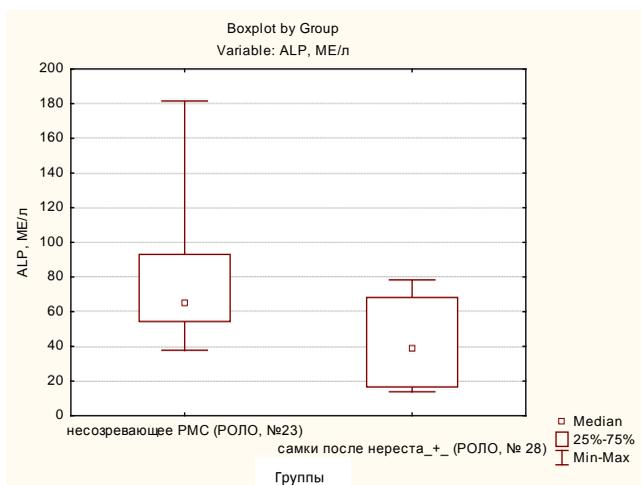


Рис. 41. Сравнение активности ALP между незрелым ремонтно-маточным стадом гибрида РОЛО и самками гибрида РОЛО, положительно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,000970$ )

## 1.5. Исследования активности $\gamma$ -глутамилтрансферазы (GGT) ремонтно-маточного стада осетровых рыб

Установлено, что активность GGT в сыворотке крови ремонтно-маточных стад и производителей осетровых зависит от различного физиологического состояния рыб.

Так, активность GGT (рис. 42) у незрелых ремонтно-маточных стад осетровых была на 254,6 % выше, чем у нормально созревающих (P = 0,000013).

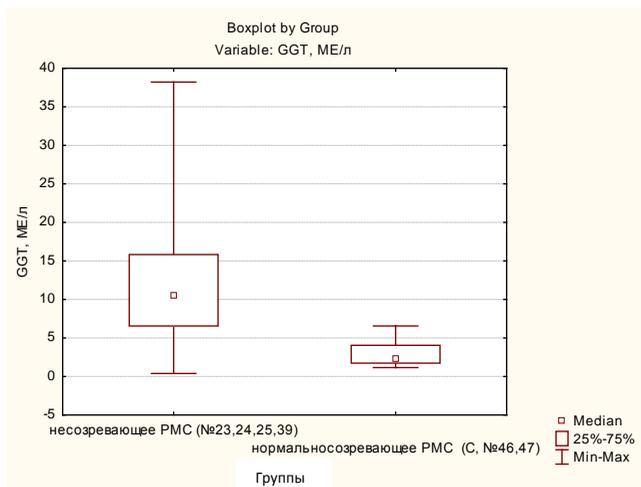


Рис. 42. Сравнение активности GGT между незрелым и нормально созревающим ремонтно-маточными стадами осетровых (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости P = 0,000013)

Нами установлены достоверные различия в активности GGT между ремонтно-маточными стадами во время осенней бонитировки и производителями после нереста. Эти различия зависели от реакции ответа на стимулирующую инъекцию, а также имели видовые особенности (рис. 43–49).

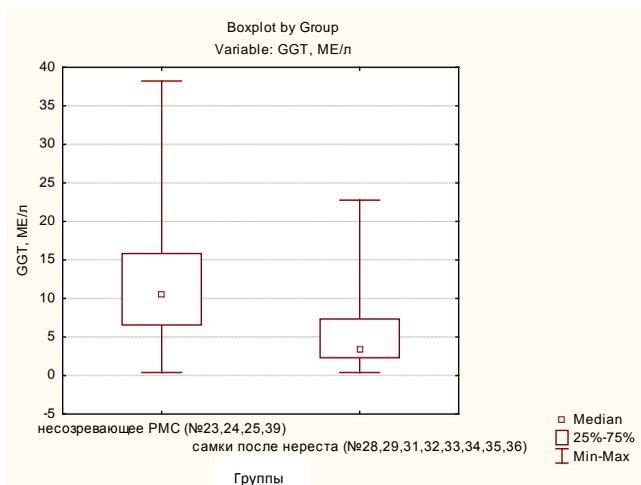


Рис. 43. Сравнение активности GGT между незрелым ремонтно-маточным стадом осетровых и самками осетровых после нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,000006$ )

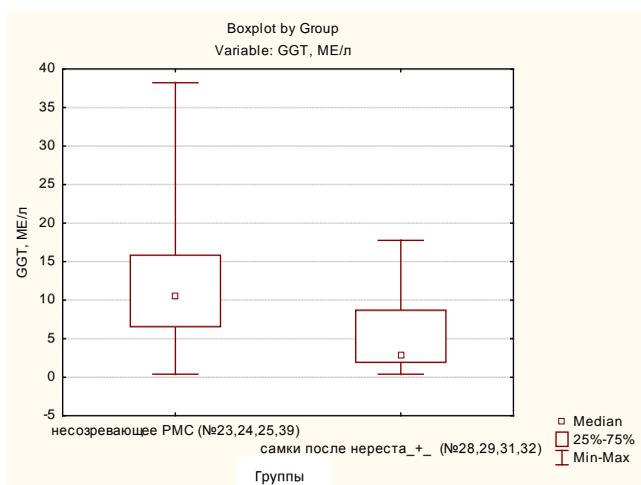


Рис. 44. Сравнение активности GGT между незрелым ремонтно-маточным стадом осетровых и самками осетровых, положительно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,000742$ )

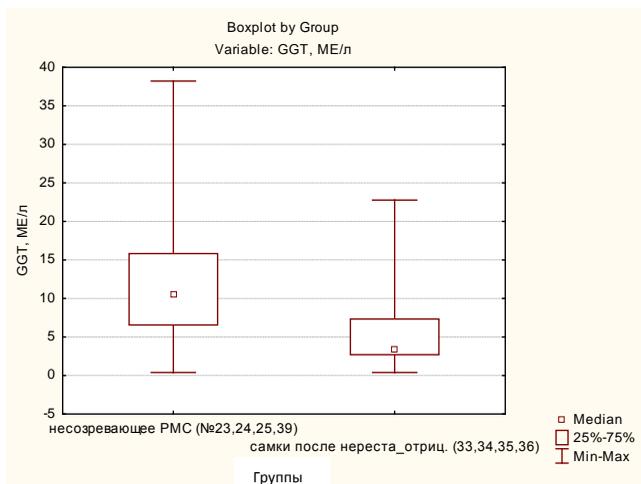


Рис. 45. Сравнение активности GGT между незрелым ремонтно-маточным стадом осетровых и самками осетровых, отрицательно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,000101$ )

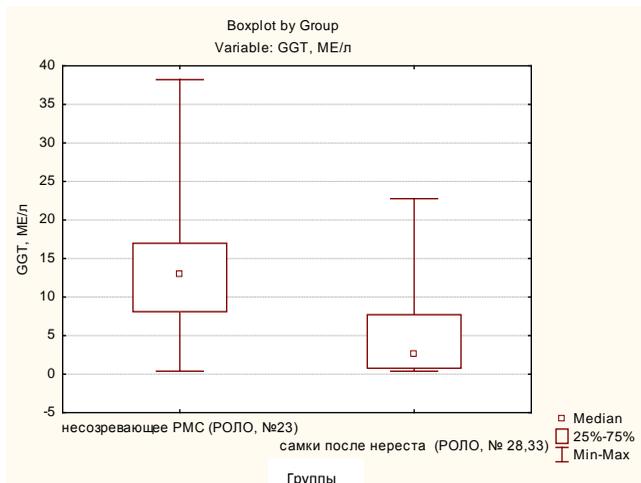


Рис. 46. Сравнение активности GGT между незрелым ремонтно-маточным стадом гибрида РОЛО и самками гибрида РОЛО после нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,003430$ )

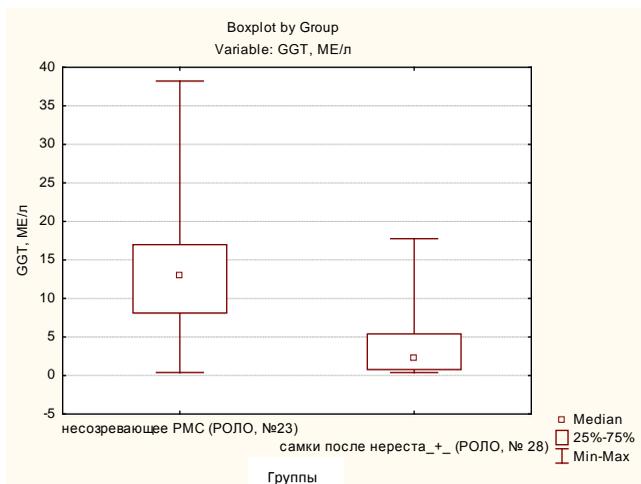


Рис. 47. Сравнение активности GGT между незрелым ремонтно-маточным стадом гибрида РОЛО и самками гибрида РОЛО, положительно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,007932$ )

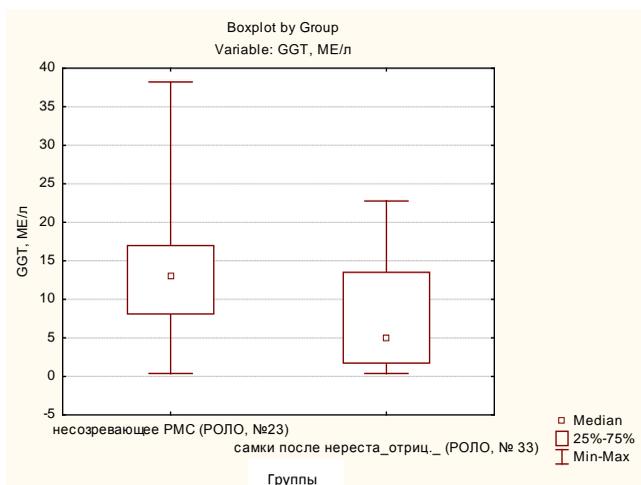


Рис. 48. Сравнение активности GGT между незрелым ремонтно-маточным стадом гибрида РОЛО и самками гибрида РОЛО, отрицательно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,057100$ )

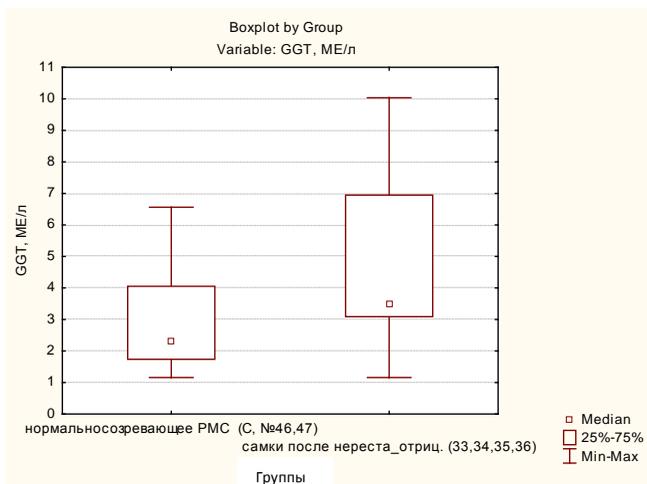


Рис. 49. Сравнение активности GGT между нормально созревающим ремонтно-маточным стадом осетровых и самками осетровых, отрицательно ответившими на стимулирующую инъекцию во время нереста (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,074911$ )

### 1.6. Методика диагностики пола и стадий зрелости осетровых рыб. Ультразвуковая диагностика ремонтно-маточного стада осетровых рыб

Хорошо известно, что для осетровых рыб характерно отсутствие четко выраженного полового диморфизма. В настоящее время существует несколько различных методов определения пола и стадий зрелости гонад незрелых осетровых, среди которых можно выделить следующие:

- биопсийные методы (рис. 50);
- эндоскопия (рис. 51–53);
- эндокринологический метод (анализ содержания половых стероидов);
- метод низкочастотного инфракрасного сканирования;
- морфометрические методы (рис. 54);
- лапароскопия и прямая пальпация (рис. 55–60);
- ультразвуковое исследование (рис. 61).



*a*



*б*

Рис. 50. Биопсийный метод определения пола и стадий зрелости гонад:  
*a* – место ввода щупа; *б* – щуп с отобранной икрой



Рис. 51. Эндоскопический метод определения пола и стадий зрелости гонад.  
Место введения эндоскопа в полость тела



Рис. 52. Диагностика пола ленского осетра эндоскопическим методом



Рис. 53. Диагностика пола лопатоноса эндоскопическим методом

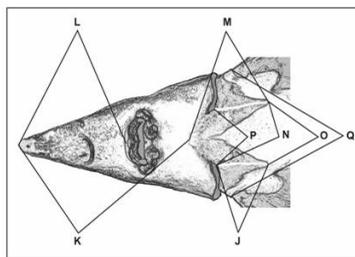
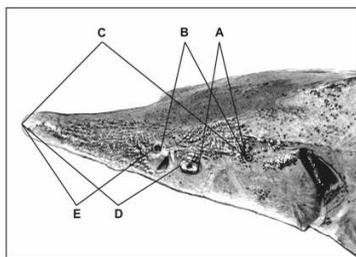


Рис. 54. Морфометрический метод определения пола и стадий зрелости гонад



Рис. 55. Лапароскопия и прямая пальпация



Рис. 56. Отоскоп для непосредственного исследования гонад осетровых при лапароскопии



*a*



*б*

Рис. 57. Процедура проведения лапароскопии: *a* – расширение разреза и визуальное исследование; *б* – нанесение шва после исследования



Рис. 58. Примеры наложения швов после лапароскопии

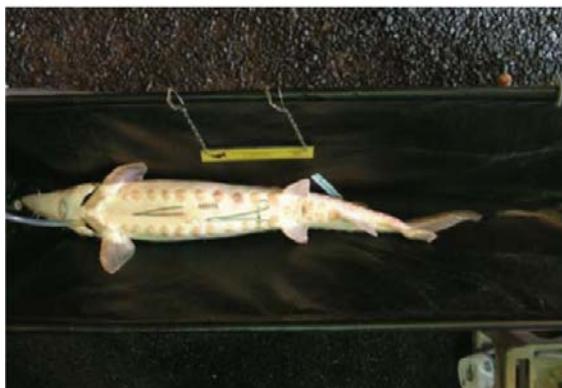


Рис. 59. Проведение анестезии при лапароскопии

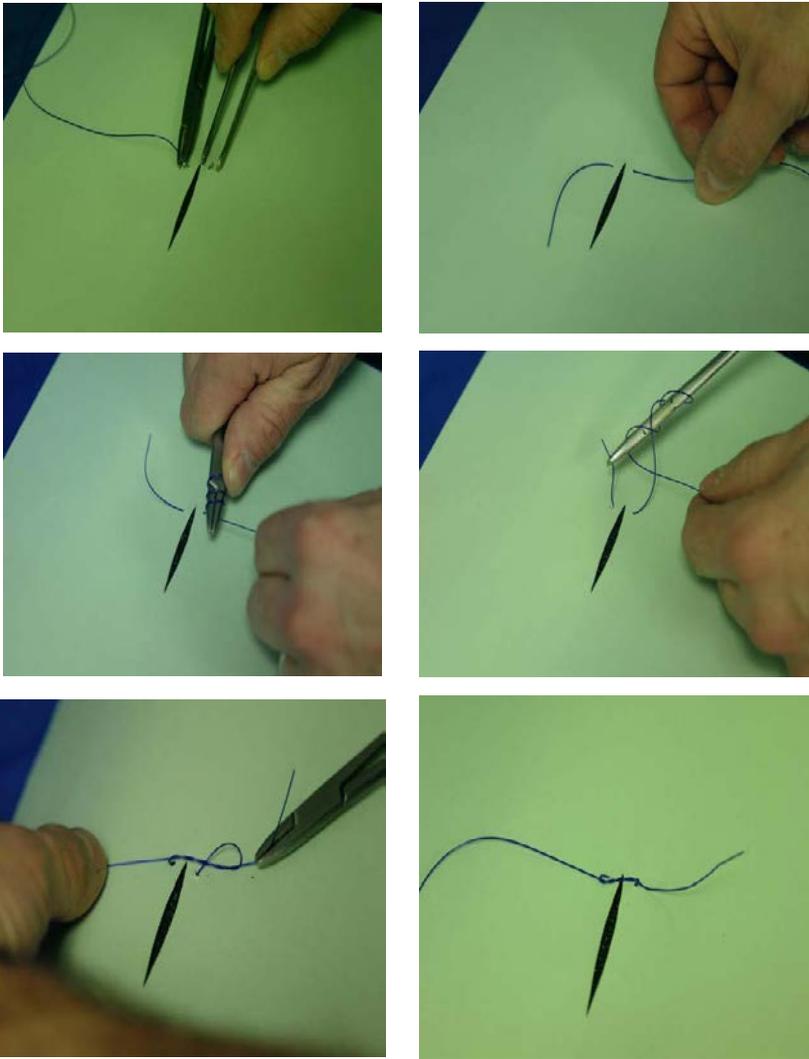


Рис. 60. Пример завязывания узлов при наложении швов во время исполнения лапароскопии



Рис. 61. УЗИ-сканер

При проведении диагностики пола в икорном осетроводстве наиболее эффективным является ультразвуковое исследование гонад.

**Особенности визуализации органов при продольном УЗИ-сканировании.** При продольном сканировании (рис. 62) видны следующие ткани и органы в порядке от сканирующей поверхности датчика (рис. 63):

1) кожа – в виде тонкой гиперэхогенной зоны и подкожная жировая клетчатка в виде узкой (2–3 мм) зоны средней эхогенности;

2) мускулатура – широкая зона смешанной эхогенности, собственно мышечная ткань – зона средней яркости (пересекаемая горизонтально полосами смешанной эхогенности), которая чередуется с межмиотомными перегородками из соединительной ткани (на мониторе выглядят как наклонные, почти вертикальные, более яркие, чем мышцы, узкие полосы);

3) серозная оболочка брюшной полости – выглядит как яркая, ровная, четкая граница;

4) гонады – половые железы самок и самцов по-разному визуализируются на экране УЗИ-сканера в зависимости от их эхоструктуры:

- могут иметь оболочку (у самцов), а также сложную структуру эхогенности: гиперэхогенность, гипозэхогенность, анэхогенность или смешанную эхогенность;

- гонады самцов – структуры однородной эхогенности, заключенные в яркие гиперэхогенные оболочки, диагностируемые по всей длине;

- гонады самок – структуры смешанной эхогенности без четких границ (оболочек), при динамическом изучении визуализируются в виде наплывающих облакообразных структур.



Рис. 62. Положение датчика УЗИ на рыбе при продольном сканировании



Рис. 63. Алгоритм анализа УЗИ-изображений

**Самцы – 2-я стадия зрелости (M2).** Начиная с 2-й стадии развития генеративная часть гонады самцов легко идентифицируется при продольном и поперечном сканировании, она гипозоногенна и имеет четкие границы. Жировая часть не развита или незначительно развита с медиальной стороны и практически не визуализируется. Края гонады плавно изогнуты, при этом хорошо просматривается яркая гиперэхогенная оболочка семенника (рис. 64).

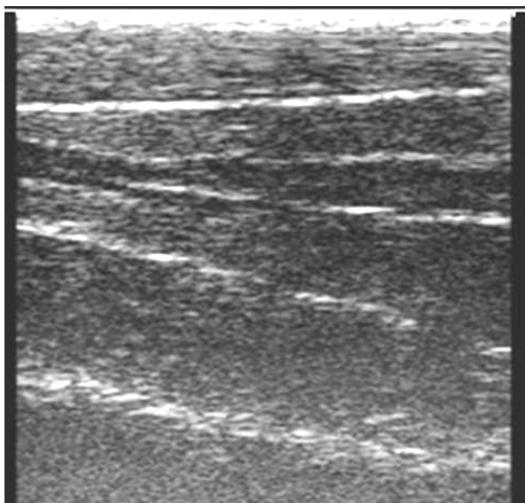


Рис. 64. Семенники стерляди 2-й стадии зрелости

**Самцы – 2-я жировая стадия зрелости (M2f).** Эхогенность генеративной ткани по сравнению с 2-й стадией зрелости незначительно увеличивается, поэтому семенник становится хорошо различим. Генеративная часть семенника приобретает однородную мелкозернистую структуру (на эхограмме – серого цвета) и отделена от жировой (гипоэхогенной, темной) гиперэхогенной границей, визуализирующейся в виде яркой белой линии (рис. 65).

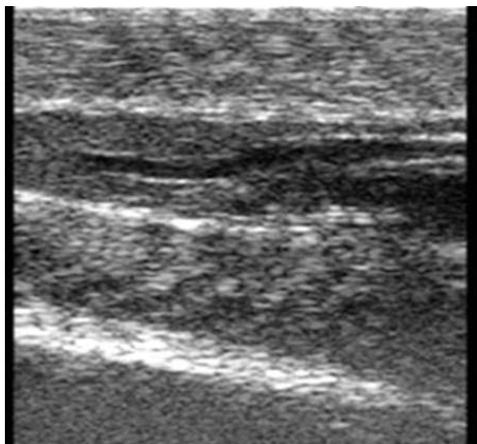


Рис. 65. Семенники стерляди 2-й жировой стадии зрелости

**Самцы – 3-я стадия зрелости (M3).** На 3-й стадии эхогенность генеративной части семенника значительно увеличивается. На эхограмме семенники выглядят как однородная мелкозернистая структура светло-серого цвета с четкими гиперэхогенными границами. За счет высокого темпа роста семенников, в период прекращения линейного роста тела, на эхограмме они выглядят «смятыми» или дольчатыми с плавно изгибающимися краями или имеют вид отдельных округлых гиперэхогенных однородных структур. В некоторых случаях хорошо визуализируются две ярко выраженные гиперэхогенные линии – границы гонады и линии брюшины (рис. 66).

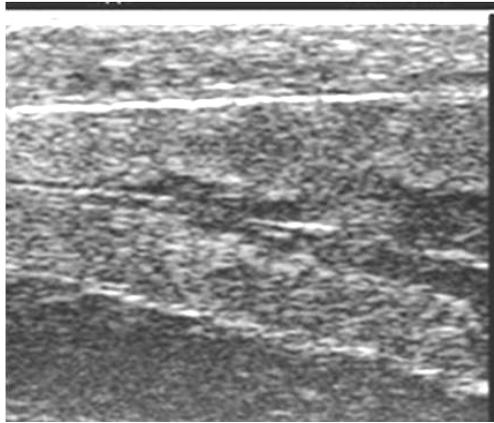


Рис. 66. Семенники стерляди 3-й стадии зрелости

**Самцы – 4-я стадия зрелости (M4).** На эхограмме семенники 4-й стадии развития визуализируются как яркая гиперэхогенная мелкозернистая однородная структура с четкими яркими краями и хорошо выраженными оболочками, которые отчетливо видны на срезах (рис. 67).

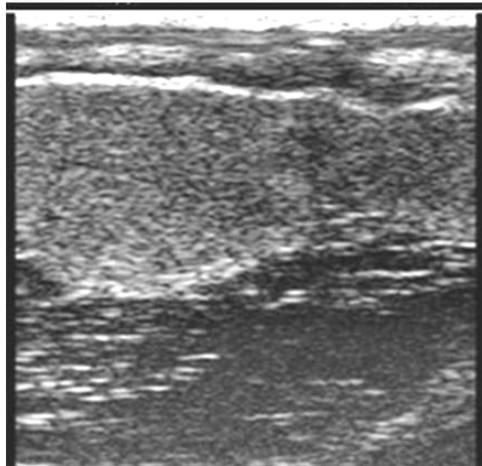


Рис. 67. Семенники стерляди 4-й стадии зрелости

**Самки – 2-я стадия зрелости (F2).** На эхограмме генеративная часть яичников 2-й стадии зрелости выглядит как зернистая облакообразная структура смешанной эхогенности с неровными краями без оболочек. Жировая часть гонады незначительна, при продольном и поперечном сканировании визуализируется в виде более темных областей, в отличие от более светлой генеративной ткани (рис. 68).

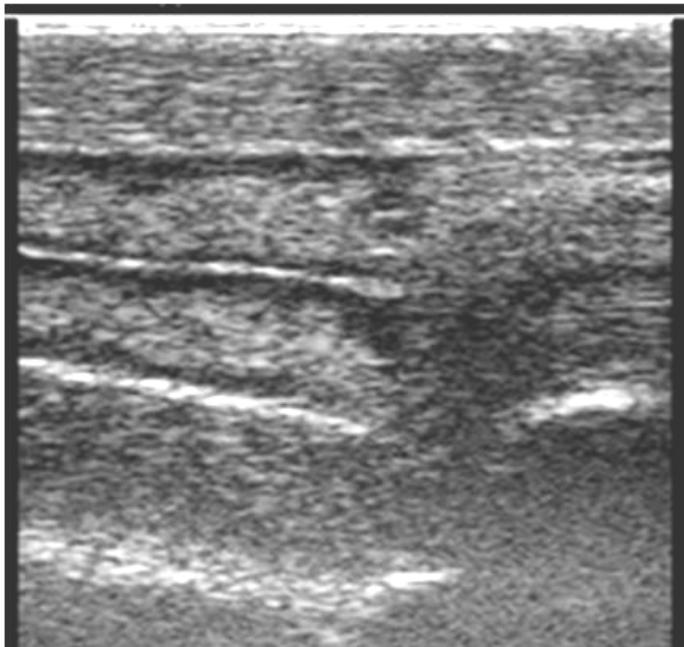


Рис. 68. Яичники стерляди 2-й стадии зрелости

**Самки – 2-я полужировая стадия зрелости (F2sf).** На эхограмме продольного среза яичников 2-й полужировой стадии зрелости видны отдельные яйценозные пластины в виде зон повышенной эхогенности, чередующиеся с гипозононными жировыми зонами. При этом яйценозные пластины прорастают от латеральной в медиальную зону гонады (рис. 69).

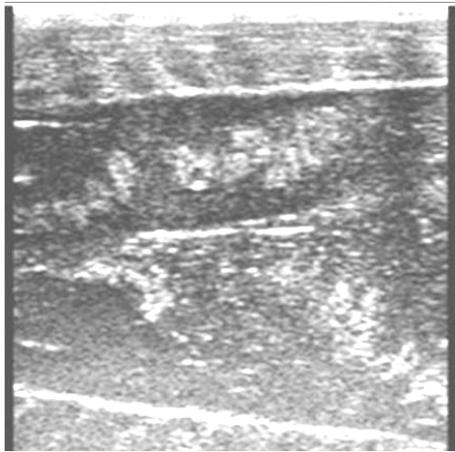


Рис. 69. Яичники стерляди 2-й полужировой стадии зрелости

**Самки – 2-я жировая стадия зрелости (F2f).** На эхограмме продольного среза яичников 2-й жировой стадии зрелости изменяется видимое соотношение генеративной и жировой тканей. Генеративная ткань гонады как с медиальной, так и с латеральной стороны окружена жировой тканью. Между мышцами и гонадой хорошо различима анэхогенная прослойка жира (рис. 70).

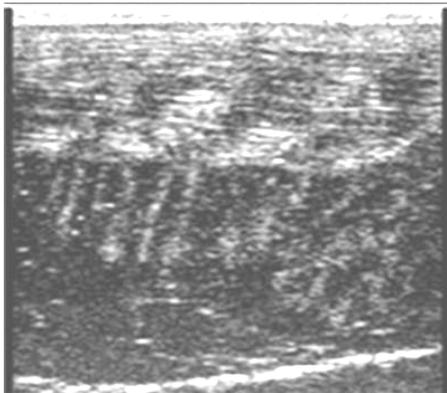


Рис. 70. Яичники стерляди 2-й жировой стадии зрелости

**Самки – 2–3-я стадии зрелости (F2–3).** На эхограмме яичник практически полностью представлен умеренной эхогенной генеративной тканью (серого и светло-серого цвета). Яйценосные пластины пронизывают тело гонады в виде разветвленных вертикальных образований (коралловидной или бахромчатой формы) повышенной эхогенности, прорастающих в темную гипоехогенную область (жировую ткань) (рис. 71).

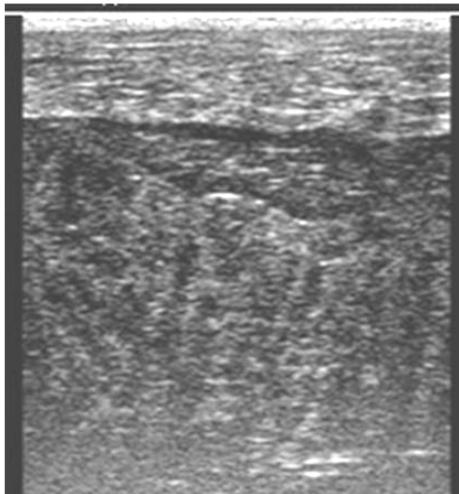


Рис. 71. Яичники стерляди 2–3-й стадий зрелости

**Самки – 3-я стадия зрелости (F3).** Третья стадия зрелости характеризуется ростом фолликулов, утолщением яйценосных пластин и значительным увеличением линейных размеров гонад и их объема. На эхограмме яичники 3-й стадии зрелости приобретают отчетливо выраженную зернистую структуру. Яйценосные пластины на эхограмме визуализируются в виде светлых размытых участков, погруженных в гипоехогенную генеративную ткань, в которой просматриваются мелкие ооциты (рис. 72).

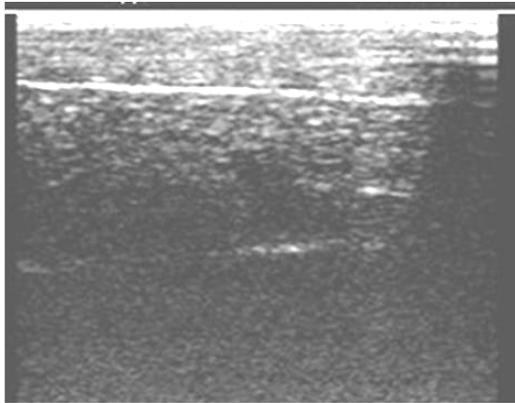


Рис. 72. Яичники стерляди 3-й стадии зрелости

**Самки – 4-я незавершенная стадия зрелости (F4i).** На эхограмме хорошо различимы крупные, однородные по размеру ооциты. Способность яичников пропускать ультразвуковые волны значительно снижается, и медиальная сторона гонады, как и нижележащие органы, уже не просматривается (рис. 73).

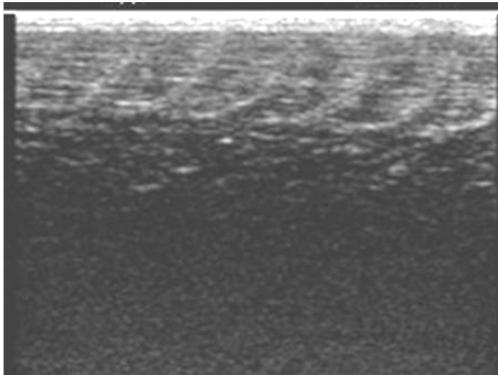


Рис. 73. Яичники стерляди 4-й незавершенной стадии зрелости

**Самки – 4-я завершенная стадия зрелости (F4c).** На эхограмме видны отдельные икринки в виде зернистых включений практически

одинакового размера, яичник имеет зернистую неоднородную структуру. Ряды (линии) ооцитов более выражены. На этой стадии ультразвук практически полностью поглощается в верхнем (1 см) слое яичника, и поэтому медиальная часть гонады и нижележащие органы под ней не визуализируются (рис. 74).

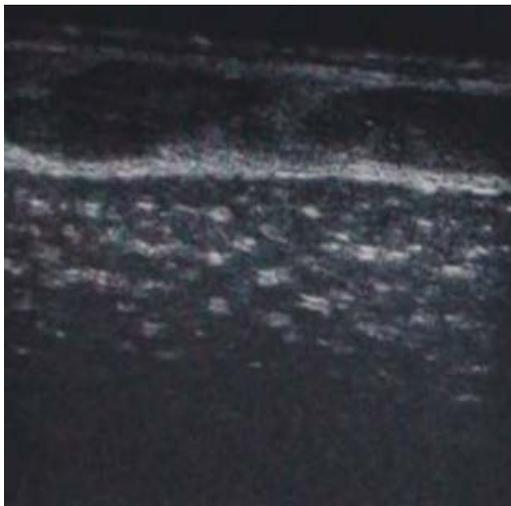


Рис. 74. Яичники стерляди 4-й завершённой стадии

### **1.7. Исследование репродуктивной функции ремонтно-маточного стада осетровых рыб методом ИФА-анализа**

*Исследование изменение концентрации тестостерона.* Установлено, что концентрация тестостерона в сыворотке крови осетровых рыб из ремонтно-маточных стад и производителей зависит от пола и стадий зрелости гонад. Так, концентрация тестостерона у самцов, имеющих семенники 2-й и 3-й стадий зрелости, превосходила таковой показатель у самок с яичниками 2-й стадии зрелости (рис. 75). Эта разница была высокодостоверна – уровень значимости составил  $P = 0,017281$ .

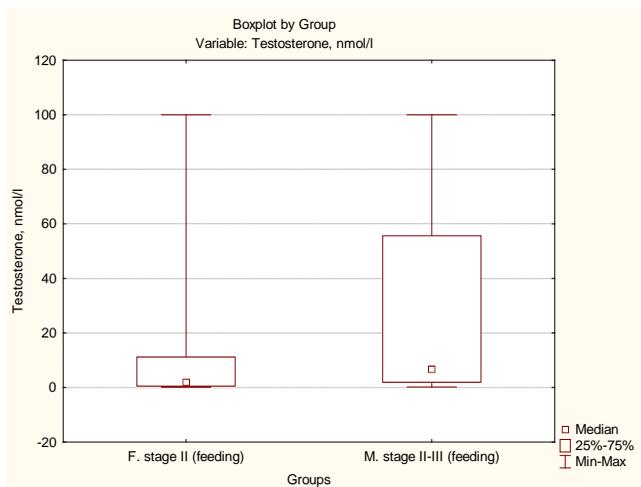


Рис. 75. Сравнение концентрации тестостерона в сыворотке крови между самками и самцами ремонтно-маточного стада стерляди (возраст 1 год 8 мес) на стадии активного нагула в условиях установки замкнутого водоснабжения (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,017281$ )

Динамика изменения концентрации тестостерона у самок осетровых рыб в зависимости от стадии зрелости представлена на рис. 76. Как видно из рисунка, концентрация тестостерона подвержена колебаниям и изменяется в зависимости от стадии развития гонад и времени года. Наиболее высокий уровень тестостерона наблюдался у самок, имеющих яичники 1-й стадии зрелости, у тугосозревающих самок с яичниками 2-й стадии зрелости и у самок перед зимовкой.

Концентрация тестостерона у самок, имеющих яичники 1-й стадии зрелости, превосходила таковой показатель у самок с яичниками 2-й стадии зрелости (рис. 77). Эта разница была высокодостоверна – уровень значимости составил  $P = 0,0003$ . Величина различий зависела от вида. Сравнение концентрации тестостерона в сыворотке крови между самками стерляди с яичниками 1-й и 2-й стадий зрелости в условиях установки замкнутого водоснабжения представлено на рис. 78, а в сыворотке крови между самками гибрида РОЛО – на рис. 79.

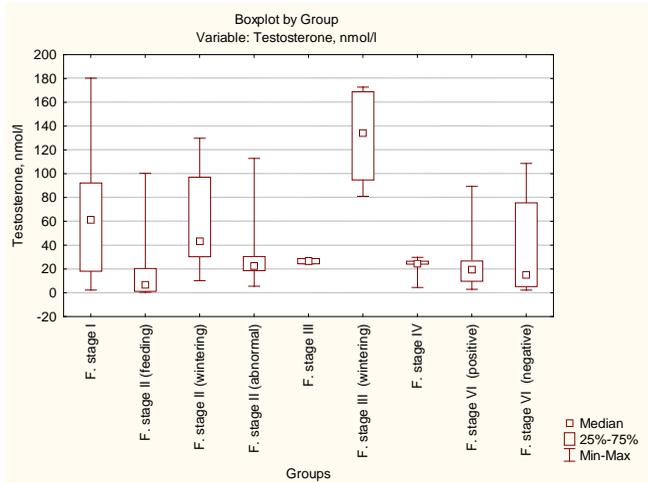


Рис. 76. Изменение концентрации тестостерона в сыворотке крови самок осетровых в зависимости от стадии зрелости яичников в условиях установки замкнутого водоснабжения (Н-тест Крускала-Уоллиса)

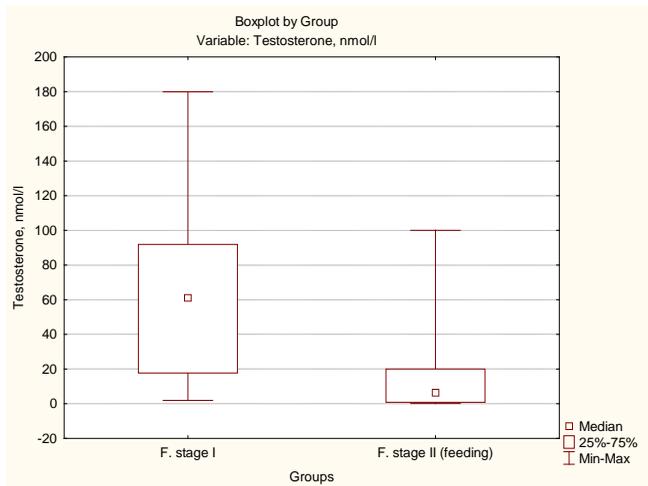


Рис. 77. Сравнение концентрации тестостерона в сыворотке крови между самками с яичниками 1-й и 2-й стадий зрелости в условиях установки замкнутого водоснабжения (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,0003$ )

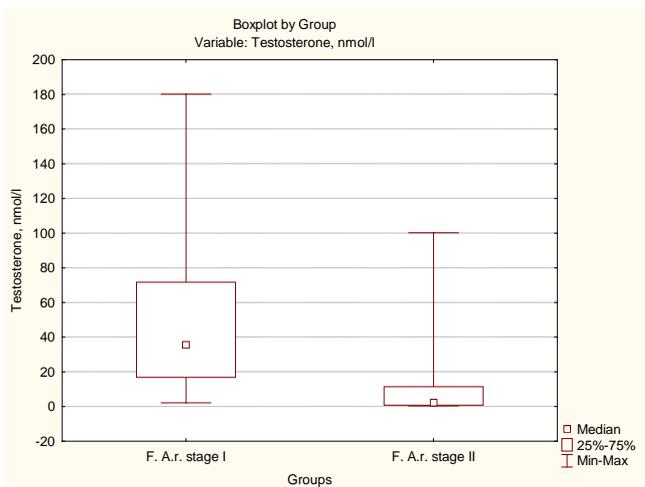


Рис. 78. Сравнение концентрации тестостерона в сыворотке крови между самками стерляди с яичниками 1-й и 2-й стадий зрелости в условиях установки замкнутого водоснабжения (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,001$ )

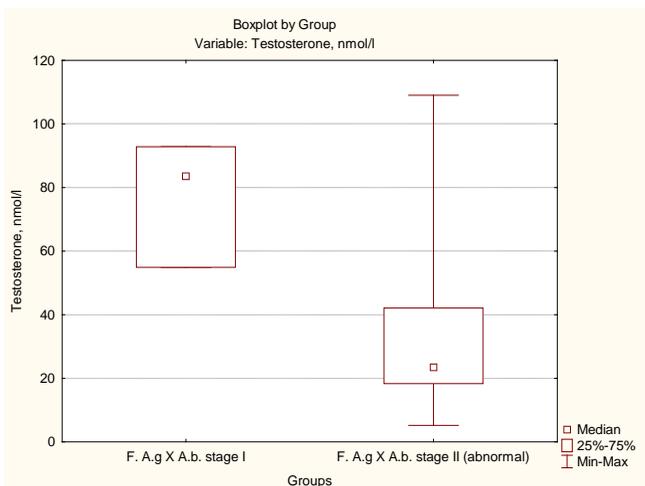


Рис. 79. Сравнение концентрации тестостерона в сыворотке крови между самками гибрида РОЛО с яичниками 1-й и 2-й стадий зрелости в условиях установки замкнутого водоснабжения (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,06$ )

Различия в изменении концентрации тестостерона в сыворотке крови зависели также от физиологического состояния самок. Так, у самок, у которых наблюдалось нарушение в развитии гонад, т. е. наблюдалась так называемая тугозрелость, нами было установлено превышение концентрации тестостерона по сравнению с нормально развивающимися и созревающими самками (рис. 80).

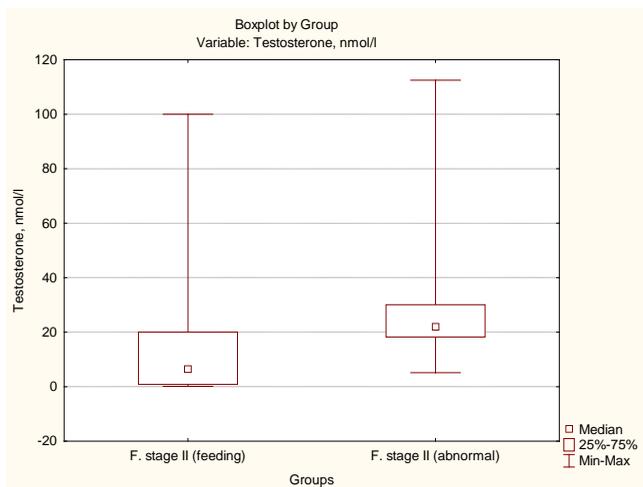


Рис. 80. Сравнение концентрации тестостерона в сыворотке крови между самками с яичниками 2-й нормально развивающейся стадии и 2-й тугоразвивающейся стадии в условиях установки замкнутого водоснабжения (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,000019$ )

Нами было обнаружено, что у самок, которые не имели положительной реакции на инъекции препаратами, стимулирующими нерест, происходило увеличение концентрации тестостерона (рис. 81). Однако данные различия были недостоверными. Тем не менее подробное изучение результатов исследований позволило установить достоверные различия в концентрации тестостерона между самками с положительным и отрицательным ответом на гормональные инъекции в период нереста у гибрида РОЛЮ (рис. 82) и ленского осетра (рис. 83).

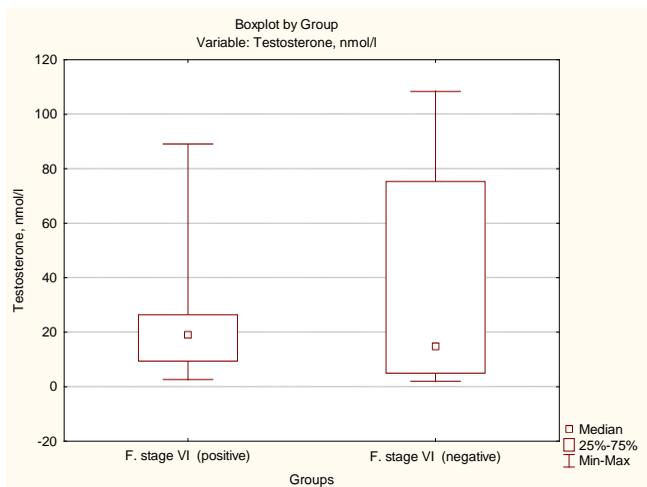


Рис. 81. Сравнение концентрации тестостерона в сыворотке крови между самками с положительным и отрицательным ответом на гормональные инъекции в период нереста в условиях установки замкнутого водоснабжения (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,97$ )

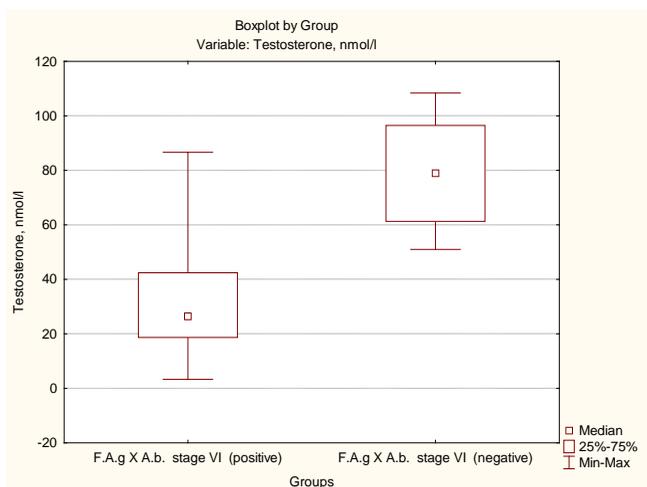


Рис. 82. Сравнение концентрации тестостерона в сыворотке крови между самками гибрида РОЛЮ с положительным и отрицательным ответом на гормональные инъекции в период нереста в условиях установки замкнутого водоснабжения (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,01$ )

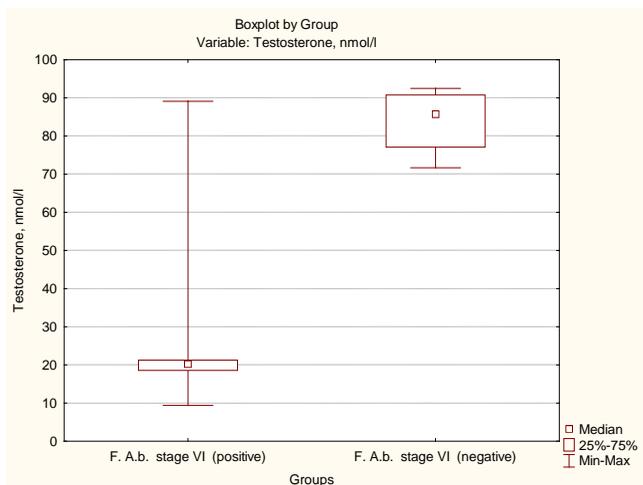


Рис. 83. Сравнение концентрации тестостерона в сыворотке крови между самками ленского осетра с положительным и отрицательным ответом на гормональные инъекции в период нереста в условиях установки замкнутого водоснабжения (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,01$ )

**Исследование изменения концентрации прогестерона.** Установлено, что концентрация прогестерона в сыворотке крови осетровых рыб из ремонтно-маточных стад и производителей зависит от пола и стадий зрелости гонад. Динамика изменения концентрации прогестерона у самок осетровых рыб в зависимости от стадии зрелости представлена на рис. 84. Как видно из рисунка, концентрация прогестерона подвержена колебаниям и изменяется в зависимости от стадии развития гонад и времени года. Наиболее высокий уровень прогестерона наблюдался у самок, имеющих яичники 2, 3 и 4-й стадий зрелости. Концентрация прогестерона у самок, имеющих яичники на 2-й стадии зрелости, превосходила таковой показатель у самок с яичниками 1-й стадии зрелости (рис. 85). Эта разница была высокодостоверна – уровень значимости составил  $P = 0,000458$ . Различия в изменении концентрации прогестерона в сыворотке крови зависели также от физиологического состояния самок. Так, у самок, у которых наблюдалось нарушение в развитии гонад, т. е. наблюдалась так называемая тугозрелость, нами было установлено превышение концентрации прогестерона по сравнению с нормально развивающимися и созревающими самками (рис. 86). Однако наблюдаемые различия были недостоверными.

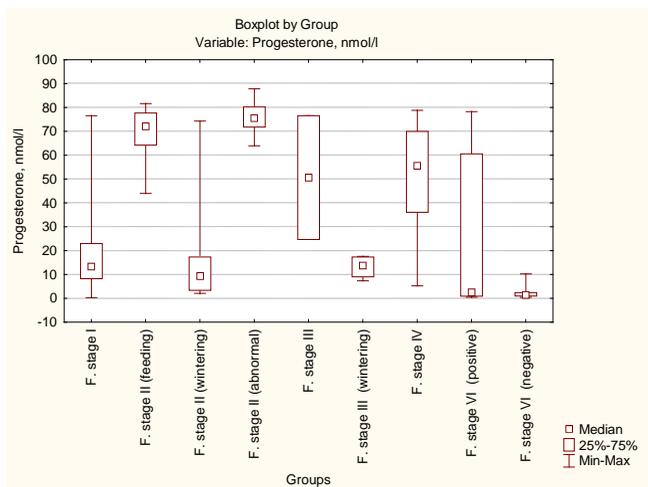


Рис. 84. Изменение концентрации прогестерона в сыворотке крови самок осетровых в зависимости от стадии зрелости яичников в условиях установки замкнутого водоснабжения (H-тест Крускала-Уоллиса)

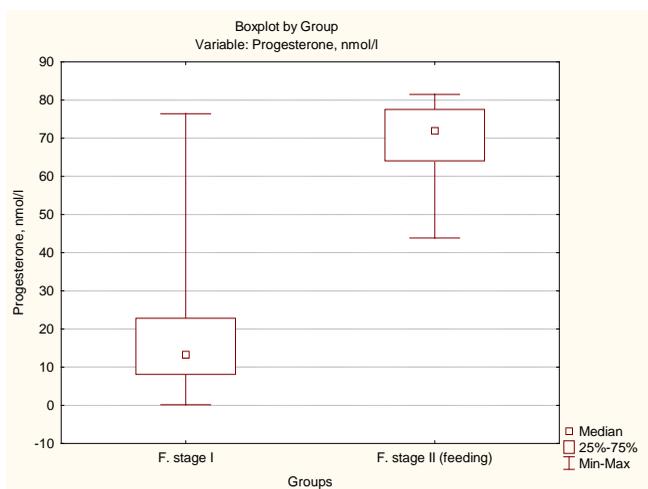


Рис. 85. Сравнение концентрации прогестерона в сыворотке крови между самками с яичниками 1-й и 2-й стадий зрелости в условиях установки замкнутого водоснабжения (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,000458$ )

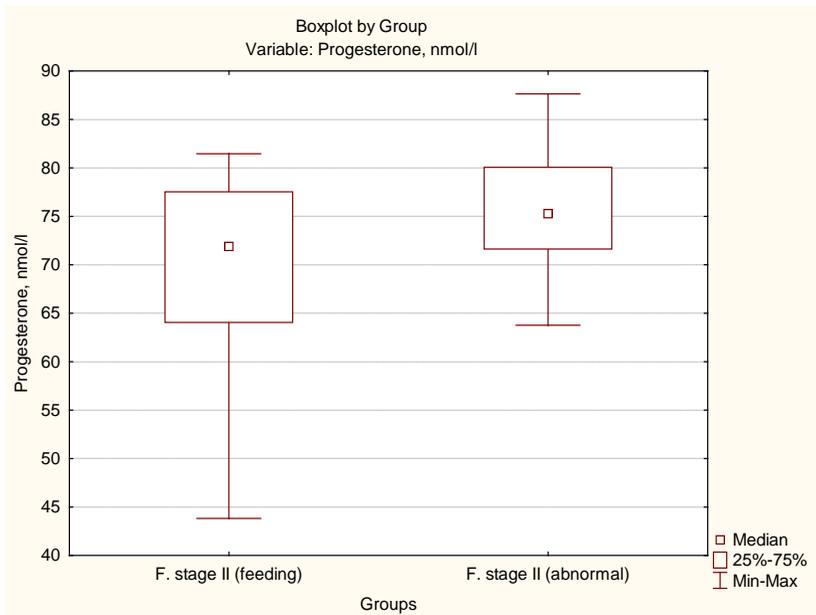


Рис. 86. Сравнение концентрации прогестерона в сыворотке крови между самками с яичниками 2-й нормально развивающейся стадии и 2-й тугоразвивающейся стадии в условиях установки замкнутого водоснабжения (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,11$ )

Нами было обнаружено, что у самок, которые не имели положительной реакции на инъекции препаратами, стимулирующими нерест, происходило снижение концентрации прогестерона (рис. 87). Однако данные различия были недостоверными. Подробное изучение результатов исследований позволило установить достоверные различия в концентрации прогестерона между самками с положительным и отрицательным ответом на гормональные инъекции в период нереста у гибрида РОЛО (рис. 88).

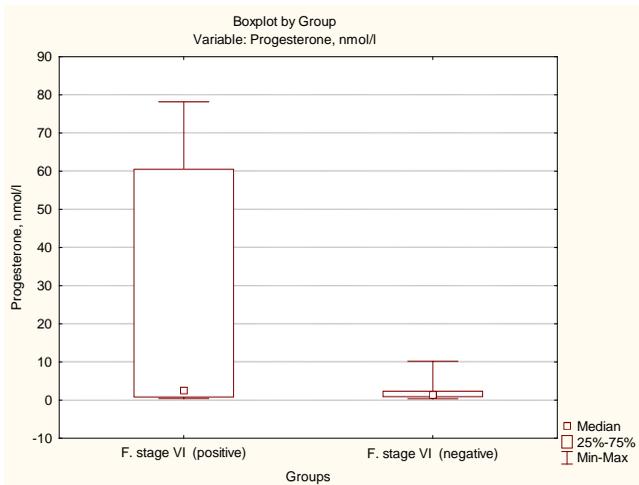


Рис. 87. Сравнение концентрации прогестерона в сыворотке крови между самками с положительным и отрицательным ответом на гормональные инъекции в период нереста в условиях установки замкнутого водоснабжения (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,20$ )

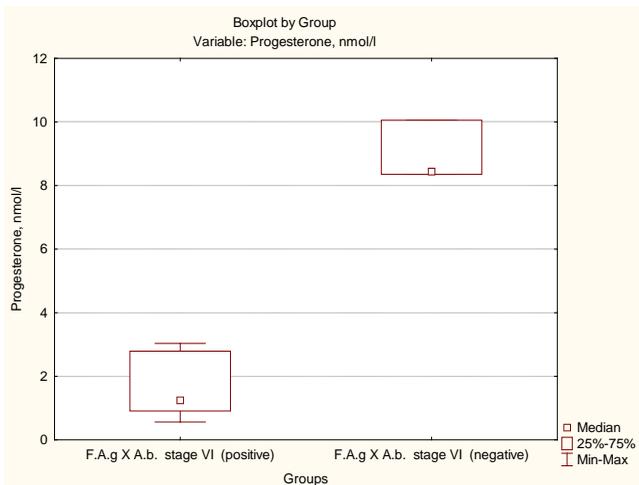


Рис. 88. Сравнение концентрации прогестерона в сыворотке крови между самками гибрида РОЛЮ с положительным и отрицательным ответом на гормональные инъекции в период нереста в условиях установки замкнутого водоснабжения (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,01$ )

**Исследование изменения концентрации эстрадиола.** Установлено, что концентрация эстрадиола в сыворотке крови осетровых рыб из ремонтно-маточных стад и производителей зависит от пола и стадий зрелости гонад.

Так, концентрация эстрадиола у самцов, имеющих семенники 2-й и 3-й стадий зрелости, превосходила таковой показатель у самок с яичниками 2-й стадии зрелости (рис. 89). Эта разница была высокодостоверна – уровень значимости составил  $P = 0,023138$ .

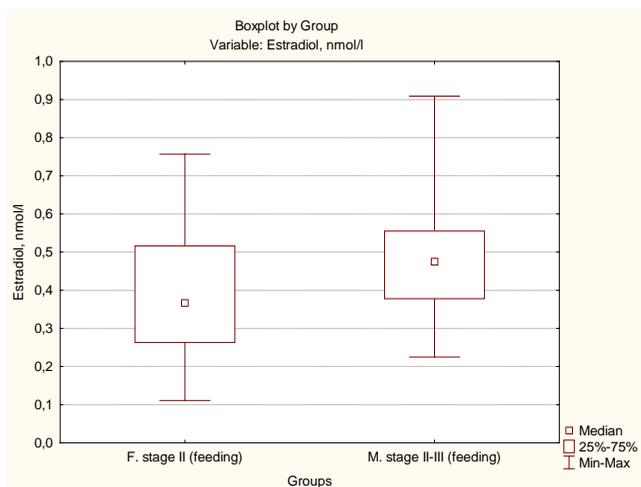


Рис. 89. Сравнение концентрации эстрадиола в сыворотке крови между самками и самцами ремонтно-маточного стада стерляди (возраст 1 год 8 мес) на стадии активного нагула в условиях установки замкнутого водоснабжения (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,023138$ )

Динамика изменения концентрации эстрадиола у самок осетровых рыб в зависимости от стадии зрелости представлена на рис. 90. Как видно из рисунка, концентрация эстрадиола подвержена колебаниям и изменяется в зависимости от стадии развития гонад и времени года. Наиболее высокий уровень эстрадиола наблюдался у самок, имеющих яичники 1-й стадии зрелости, у тугосозревающих самок с яичниками 2-й стадии зрелости и у самок после нереста.

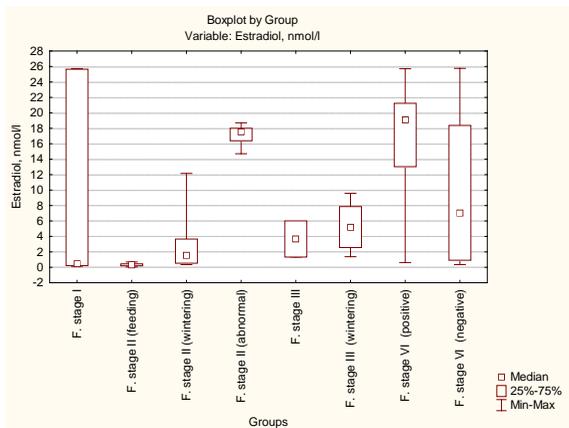


Рис. 90. Изменение концентрации эстрадиола в сыворотке крови самок осетровых в зависимости от стадии зрелости яичников в условиях установки замкнутого водоснабжения (H-тест Крускала-Уоллиса)

Концентрация эстрадиола у самок, имеющих яичники 1-й стадии зрелости, превосходила таковой показатель у самок с яичниками 2-й стадии зрелости (рис. 91). Однако данные различия были недостоверными. Величина различий зависела от вида.

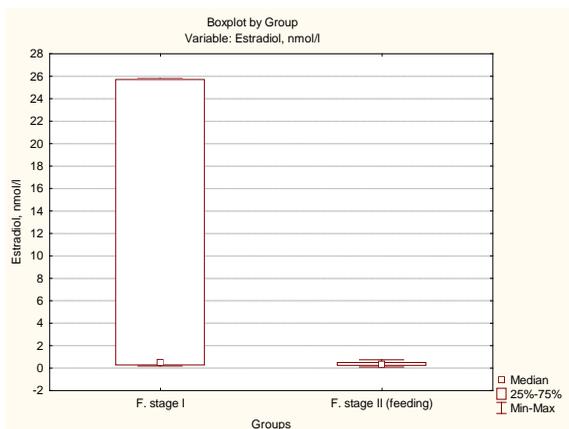


Рис. 91. Сравнение концентрации эстрадиола в сыворотке крови между самками с яичниками 1-й и 2-й стадий зрелости в условиях установки замкнутого водоснабжения (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,069$ )

Различия в изменении концентрации эстрадиола в сыворотке крови зависели также от физиологического состояния самок. Так, у самок, у которых наблюдалось нарушение в развитие гонад, т. е. наблюдалась так называемая тугозрелость, нами было установлено превышение концентрации эстрадиола по сравнению с нормально развивающимися и созревающими самками (рис. 92).

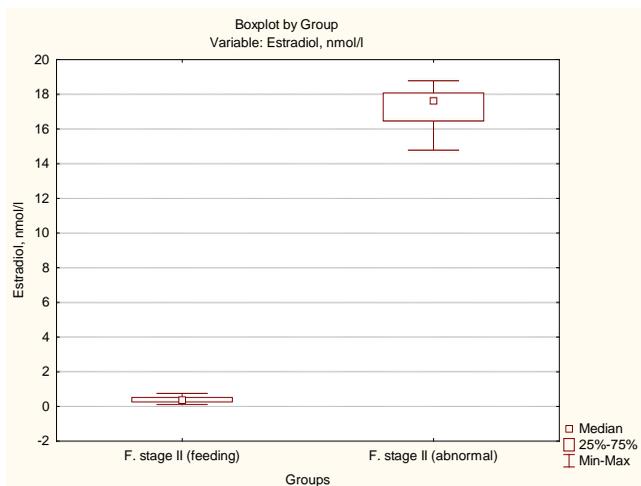


Рис. 92. Сравнение концентрации эстрадиола в сыворотке крови между самками с яичниками 2-й нормально развивающейся стадии и 2-й туго развивающейся стадии в условиях установки замкнутого водоснабжения (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,00002$ )

Нами было обнаружено, что у самок, которые не имели положительной реакции на инъекции препаратами, стимулирующими нерест, происходило снижение концентрации эстрадиола (рис. 93).

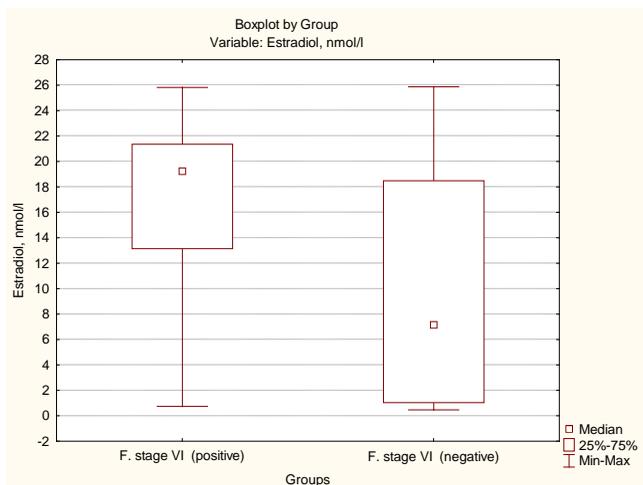


Рис. 93. Сравнение концентрации эстрадиола в сыворотке крови между самками с положительным и отрицательным ответом на гормональные инъекции в период нереста в условиях установки замкнутого водоснабжения (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,04$ )

**Исследование изменения концентрации дегидроэпиандростеронсульфата (ДГЭАС).** Установлено, что концентрация ДГЭАС в сыворотке крови осетровых рыб из ремонтно-маточных стад и производителей зависит от пола и стадий зрелости гонад.

Так, концентрация ДГЭАС у самцов, имеющих семенники 2-й и 3-й стадий зрелости, превосходила таковой показатель у самок с яичниками 2-й стадии зрелости (рис. 94). Эта разница была высокодостоверна – уровень значимости составил  $P = 0,0000003$ .

Динамика изменения концентрации ДГЭАС у самок осетровых рыб в зависимости от стадии зрелости представлена на рис. 95. Как видно из рисунка, концентрация ДГЭАС подвержена колебаниям и изменяется в зависимости от стадии развития гонад и времени года. Наиболее высокий уровень ДГЭАС наблюдался у самок, имеющих яичники 1-й стадии зрелости, у тугосозревающих самок с яичниками 2-й стадии зрелости.

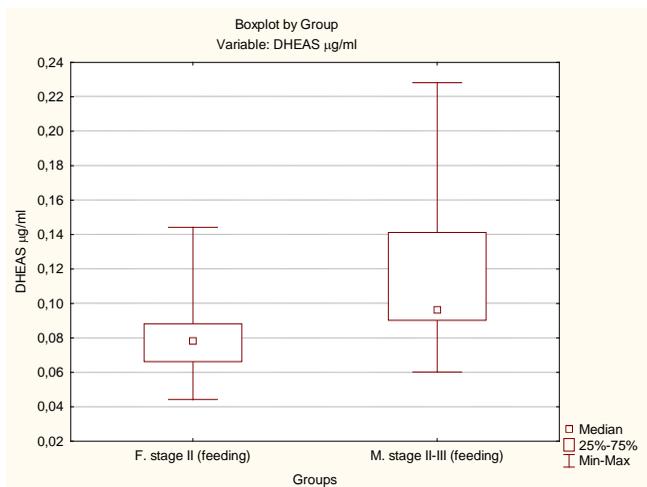


Рис. 94. Сравнение концентрации ДГЭАС в сыворотке крови между самками и самцами ремонтно-маточного стада стерляди (возраст 1 год 8 мес) на стадии активного нагула в условиях установки замкнутого водоснабжения (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,0000003$ )

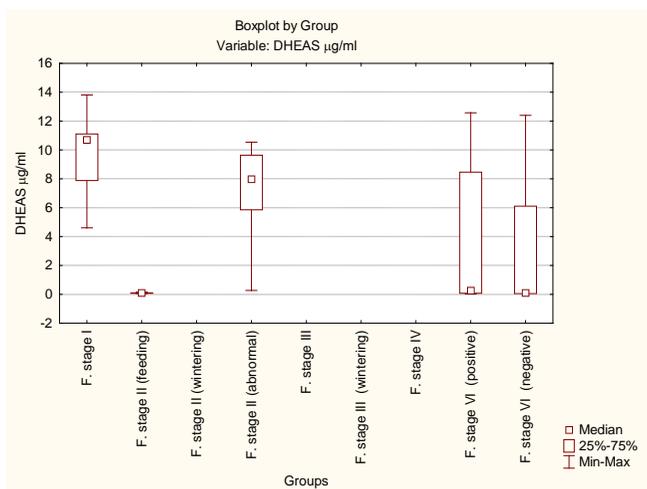


Рис. 95. Изменение концентрации ДГЭАС в сыворотке крови самок осетровых в зависимости от стадии зрелости яичников в условиях установки замкнутого водоснабжения (H-тест Крускала-Уоллиса)

Концентрация ДГЭАС у самок, имеющих яичники 1-й стадии зрелости, превосходила таковой показатель у самок с яичниками 2-й стадии зрелости (рис. 96). Эта разница была высокодостоверна – уровень значимости составил  $P = 0,0009$ .

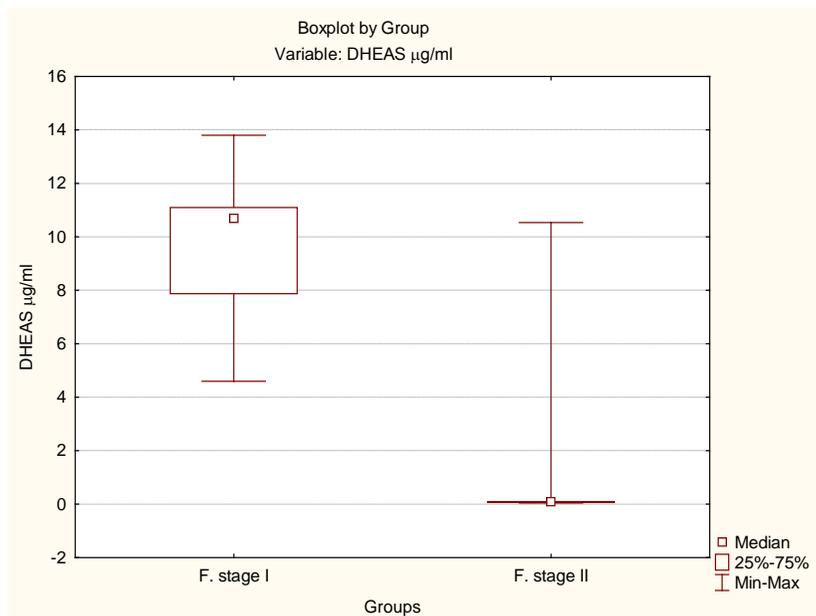


Рис. 96. Сравнение концентрации дегидроэпандростерон-сульфата в сыворотке крови между самками с яичниками 1-й и 2-й стадий зрелости в условиях установки замкнутого водоснабжения (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,0009$ )

Различия в изменении концентрации ДГЭАС в сыворотке крови зависели также от физиологического состояния самок. Так, у самок, у которых наблюдалось нарушение в развитии гонад, т. е. наблюдалась так называемая тугозрелость, нами было установлено превышение концентрации ДГЭАС по сравнению с нормально развивающимися и созревающими самками (рис. 97).

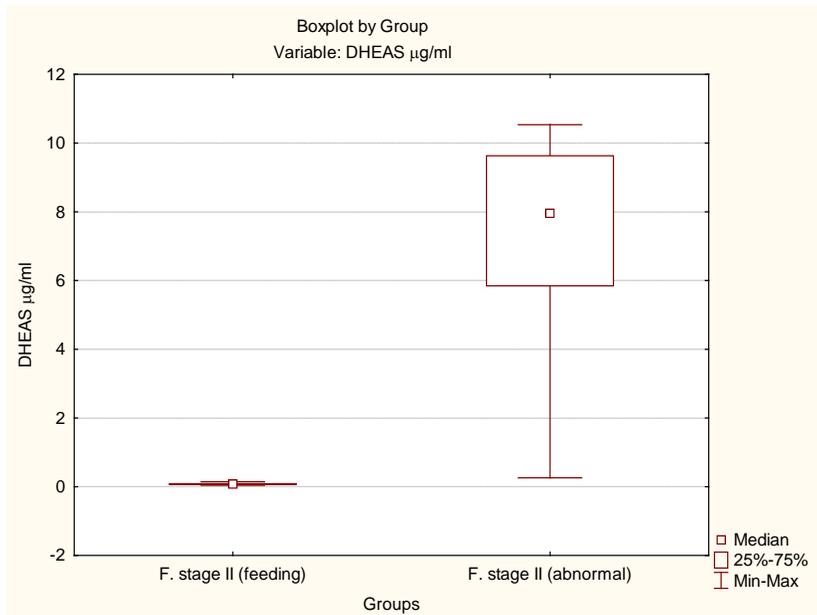


Рис. 97. Сравнение концентрации дегидроэпиандростерон-сульфата в сыворотке крови между самками с яичниками 2-й нормально развивающейся стадии и 2-й тугоразвивающейся стадии в условиях установки замкнутого водоснабжения (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,000002$ )

**Исследование изменения концентрации фолликулостимулирующего (ФСГ) и лютеинизирующего (ЛГ) гормонов.** На рис. 98–102 представлены результаты сравнительных исследований концентрации ФСГ и ЛГ в зависимости от стадий развития гонад. На данных рисунках представлены достоверные результаты, полученные в ходе статистического анализа.

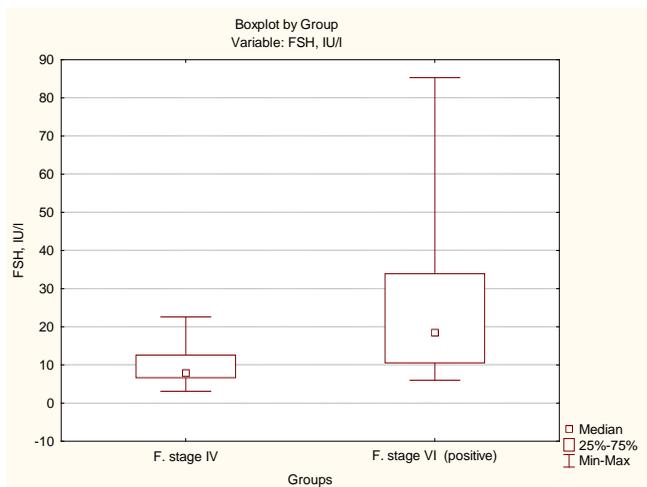


Рис. 98. Сравнение концентрации фолликулостимулирующего гормона в сыворотке крови между самками с яичниками 4-й стадии зрелости и самками с положительным ответом на гормональные инъекции в период нереста в условиях установки замкнутого водоснабжения (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,004$ )

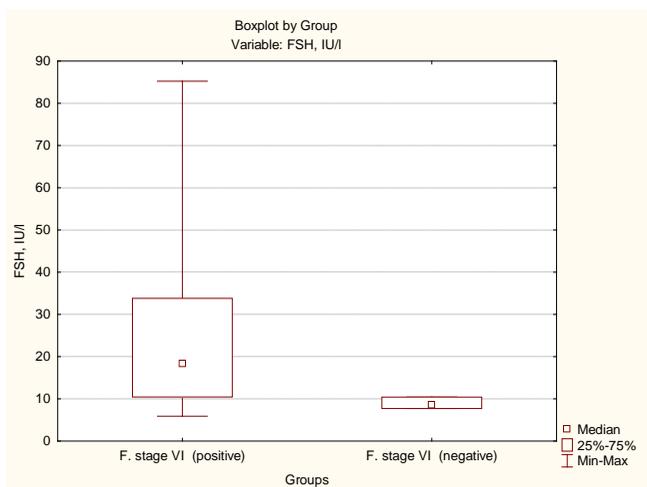


Рис. 99. Сравнение концентрации фолликулостимулирующего гормона в сыворотке крови между самками с положительным и отрицательным ответом на гормональные инъекции в период нереста в условиях установки замкнутого водоснабжения (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,04$ )

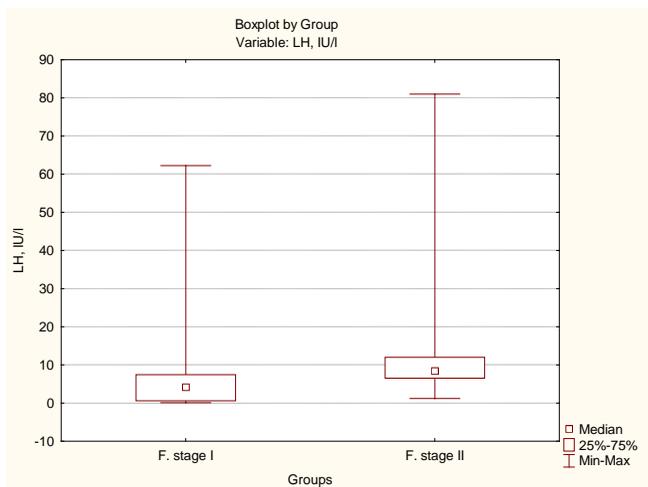


Рис. 100. Сравнение концентрации лютеинизирующего гормона в сыворотке крови между самками с яичниками 1-й и 2-й стадиями зрелости в условиях установки замкнутого водоснабжения (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,04$ )

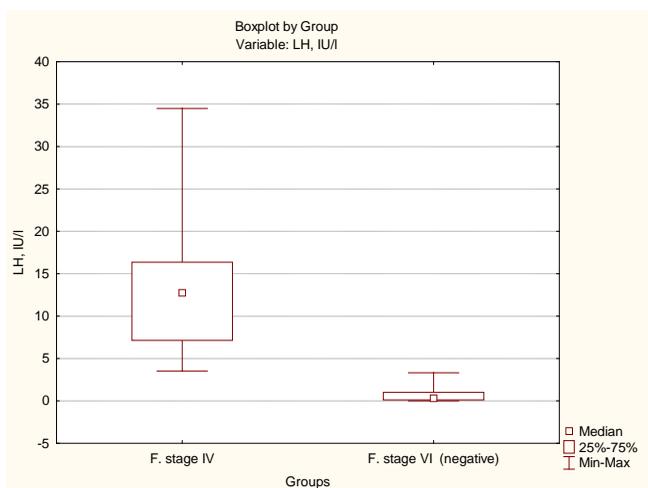


Рис. 101. Сравнение концентрации лютеинизирующего гормона в сыворотке крови между самками с яичниками 4-й стадии зрелости и самками с отрицательным ответом на гормональные инъекции в период нереста в условиях установки замкнутого водоснабжения (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,0000009$ )

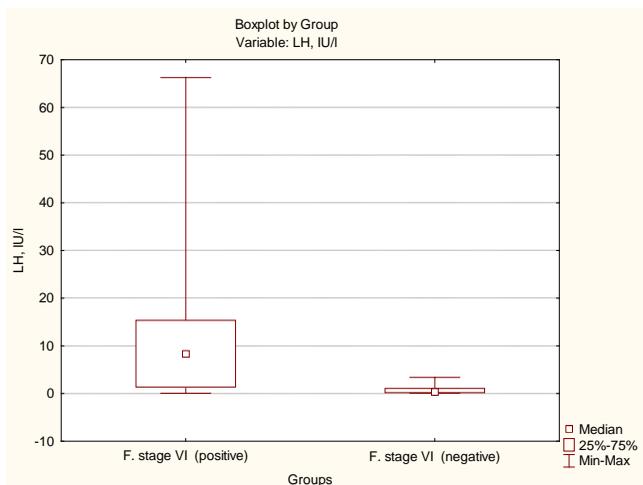


Рис. 102. Сравнение концентрации лютеинизирующего гормона в сыворотке крови между самками с положительным и отрицательным ответом на гормональные инъекции в период нереста в условиях установки замкнутого водоснабжения (U-критерий Манна-Уитни, уровень значимости  $P = 0,0003$ )

### 1.8. Биохимические исследования сыворотки крови ремонтного стада осетровых рыб

Биохимические исследования сыворотки крови получили широкое распространение в практике медицинской и ветеринарной диагностики. Современные методы биохимии позволяют осуществлять углубленное изучение физиологического состояния животных и рыб на самых разных этапах технологического процесса и стадиях их жизненного цикла. Однако, как в медицине и ветеринарии, так и в аквакультуре, необходима разработка биохимических норм в зависимости от вида, пола, возраста, стадий половой зрелости, условий содержания и региона выращивания. Результаты биохимических исследований сыворотки крови ремонтного стада стерляди (возраст 1,5 года) представлены в табл. 1.

Таблица 1. Биохимические показатели сыворотки крови ремонтного стада стерляди (1,5 года) в условиях УЗВ

Показатель	Самка	Самец	p-level
ALT, U/l	27,89 ± 2,60	34,39 ± 2,78	0,1600
AST, U/l	267,64 ± 6,81	284,39 ± 14,37	0,1800
GGT, U/l	2,04 ± 0,42	1,64 ± 0,21	0,7500
ALP, U/l	51,14 ± 8,27	62,79 ± 6,53	0,3500
LDH, U/l	777,39 ± 63,03	711,05 ± 61,53	0,4300
UA, mmol/l	119,22 ± 12,65	156,68 ± 12,54	0,0040
TP, g/l	36,54 ± 1,56	34,60 ± 1,80	0,3900
Chol, mmol/l	2,87 ± 0,18	3,90 ± 0,12	0,0001
TG, mmol/l	7,72 ± 0,46	10,40 ± 1,01	0,0500
Ca, mmol/l	2,07 ± 0,06	2,15 ± 0,08	0,9400
P, mmol/l	1,78 ± 0,11	1,92 ± 0,13	0,6200

Из анализа данных, представленных в таблице, видно, что существуют некоторые половые различия в биохимическом состоянии сыворотки крови ремонтного стада стерляди одного возраста (1,5 года). Так, достоверно установлено, что по таким показателям, как мочевая кислота, холестерин и триглицериды, наблюдается превышение аналогичных показателей у самок на 31,4 %, 35,8 и 34,7 % соответственно. Такие различия, вероятно, обусловлены особенностями формирования половых органов у самцов и самок на различных этапах онтогенеза.

#### **Выводы.**

1. Комплекс проведенных исследований и анализ полученных данных показывают, что эффективность искусственного воспроизводства осетровых рыб в условиях икорно-товарной аквакультуры в значительной степени зависит от состояния печени, об этом свидетельствует динамика активности и концентрации гепатоспецифических маркеров:

- активность аспартатаминотрансферазы у тугосозревающих (несозревающих) рыб из ремонтно-маточного стада была достоверно ниже, чем у нормально созревающих, она существенно повышается в нерестовый период. При этом у рыб с отрицательным результатом в период нерестовой кампании активность аспартатаминотрансферазы была существенно выше, чем у нормально созревших производителей, это

свидетельствовало о некротическом поражении гепатоцитов, что подтверждалось и ультразвуковыми исследованиями;

- активность аланинаминотрансферазы существенно повышается в нерестовый период, однако у рыб с отрицательным результатом в данный период активность аланинаминотрансферазы была существенно выше, чем у нормально созревших производителей, это свидетельствовало о некротическом поражении гепатоцитов, жировой дистрофии, что подтверждалось и ультразвуковыми исследованиями;

- активность щелочной фосфатазы была выше как у тугосозревающего ремонтно-маточного стада по сравнению с нормально созревающим РМС в период бонитировки, так и у производителей с отрицательным результатом в период нерестовой кампании, это свидетельствовало о патологических процессах, происходящих в печени, что подтверждалось и ультразвуковыми исследованиями.

2. В результате проведенных исследований была определена активность гепатоспецифических ферментов, концентрация метаболитов белкового и минерального обменов в зависимости от физиологического состояния рыб, морфологического и патологического состояния их печени и гонад. Установлена зависимость репродуктивных характеристик от активности гепатоспецифических ферментов.

3. Была определена концепция гепатоспецифического механизма регулирования воспроизводительной функции осетровых рыб в условиях икорно-товарной аквакультуры Беларуси, а также получены новые данные для составления их гепатоспецифического метаболического профиля, который необходимо использовать для комплексной оценки функционального состояния печени в зависимости от вида, возраста, пола, технологии выращивания.

4. В результате проведенных гормональных исследований было установлено, что концентрация андрогенов у рыб достоверно изменяется в зависимости от пола, стадии зрелости и физиологического состояния их. Нами установлено, что у рыб, имеющих нарушения в созревании, а также у тех, у которых наблюдалось замедленное развитие яичников, отмечалось достоверное увеличение концентрации тестостерона и ДГЭАС. Данная динамика была характерна для рыб с отрицательным ответом на инъекции препаратами, стимулирующими нерест. Повышенная концентрация тестостерона и ДГЭАС может указывать на гиперпродукцию андрогенов в организме самок, имеющих нарушения репродуктивной функции, в том числе нарушения в работе надпочечников и печени. Таким образом, рекомендуется определение концентрации тестостерона и ДГЭАС в качестве маркеров для выявления нарушений воспроизводи-

тельной функции осетровых рыб в процессе бонитировки ремонтно-маточных и маточных стад самок для икорной аквакультуры.

5. Анализ данных показывает, что существуют некоторые половые различия в биохимическом состоянии сыворотки крови ремонтного стада стерляди одного возраста. Так, достоверно установлено, что по таким показателям, как мочевая кислота, холестерин и триглицериды, наблюдается превышение аналогичных показателей у самок на 31,4 %, 35,8 и 34,7 % соответственно. Такие различия обусловлены особенностями формирования половых органов у самцов в период вителлогенеза.

## **2. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ ОПТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НИЗКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ В ТЕХНОЛОГИИ ВОСПРОИЗВОДСТВА ОСЕТРОВЫХ РЫБ**

### **2.1. Низкоинтенсивное оптическое излучение: основные свойства и взаимодействие с биологическими системами. Применение в сельском хозяйстве и аквакультуре**

Стимулирующие эффекты световых источников естественного (Солнце, Луна) и искусственного происхождения известны давно. Еще в 1903 г. Нобелевской премией были отмечены работы датского врача Нильса Финзена, посвященные медицинскому применению красного света и ультрафиолета для лечения оспы и волчанки. Настоящий подъем, привлекая большую группу исследователей, наступил после создания лазеров, оказавшихся удобными источниками монохроматического излучения.

Первые результаты, свидетельствующие о биологическом стимулирующем действии низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ), относятся к концу 60-х – началу 70-х годов XX ст., они были получены с использованием гелий-неонового лазера ( $\lambda = 632,8$  нм) – в то время одного из немногих промышленно выпускаемых лазеров.

Первое официальное разрешение на применение лазера в клинической практике (He-Ne лазер) было получено в 1974 г. И. М. Корочкиным и сотрудниками, удостоенными впоследствии (в 1984 г.) Государственной премии СССР за разработку лазерного метода лечения ишемической болезни сердца. За прошедшие 35 лет НИЛИ получило широкое распространение и заняло особое место (например, в медицине) в ряду применявшихся до этого в практике лечебных физических факторов. Вместе с тем бурное развитие лазерной техники, обеспечивающей получение излучения в широком диапазоне длин волн, интен-

сивностей и режимов воздействия, открывает новые горизонты для исследователей.

Лазерное излучение – разновидность неионизирующего электромагнитного излучения, характеризующегося когерентностью, поляризованностью, монохроматичностью. Лазеры генерируют электромагнитное излучение в различных участках спектрального диапазона – от ультрафиолетового до инфракрасного. Мощность лазерных установок колеблется от долей милливатт до сотен мегаватт.

Лазерная аппаратура, лазерные приборы, установки, системы являются сегодня неотъемлемым элементом технической инфраструктуры всех индустриально развитых стран. Создание лазерной техники стало отраслью индустрии, весьма заметным сектором мирового рынка наукоемкой продукции.

Лазерное излучение прочно вошло в арсенал современной медицины всех промышленно развитых стран мира благодаря следующим положительным качествам: а) высокая терапевтическая эффективность и широкий спектр показаний к применению метода, включая лечение хронических и дегенеративно-дистрофических заболеваний, когда только лекарственная терапия является недостаточно эффективной; б) отсутствие (в подавляющем большинстве) побочных эффектов, свойственных многим фармпрепаратам; в) возможность применения в комплексе с медикаментозной терапией и другими физиотерапевтическими факторами; г) доступность аппаратуры.

В настоящее время лазерное излучение применяют в кардиологии, пульмонологии, гастроэнтерологии и других областях медицины с различными целями: облечение крови и суставов при ревматоидном артрите; лечение мужского бесплодия, глазных болезней, включая глаукому, дисфункции мочевого пузыря, ишемической болезни сердца, кожных болезней и болезней крови, осложнений при хирургических травмах; при лечении тяжелой и крайне тяжелой хронической обструктивной болезни легких, в комплексной терапии хронического пародонтита и др.

Основными техническими характеристиками лазерной терапевтической аппаратуры являются: интенсивность, спектральный диапазон, длительность экспозиции, средняя мощность, режимы воздействия, а также типы источников излучения.

В отличие от высокоинтенсивного лазерного излучения, которое вызывает испарение и коагуляцию облучаемых тканей, низкоинтенсивное лазерное излучение (менее  $100 \text{ мВт/см}^2$ ), не вызывая выраженных изменений морфологической структуры тканей и не изменяя

внутримолекулярных связей, влияет на энергетический потенциал молекул и кинетику биохимических процессов.

Особенностью биологического действия электромагнитного излучения оптического диапазона является ярко выраженная зависимость биологического эффекта от длины волны излучения. Меняя длину волны, можно избирательно запускать те или иные фотобиологические процессы. В настоящее время наиболее широкое применение в клинической практике нашли лазерные терапевтические аппараты с длиной волны  $\lambda = 670, 780, 830, 880$  нм (непрерывный режим), а также с  $\lambda = 890$  и  $904$  нм (импульсный режим).

По нашему мнению, одной из причин такого приоритета указанных длин волн является их соответствие так называемому окну прозрачности биологических тканей, чем обеспечивается наибольшая глубина проникновения излучения в ткань.

Эффективность НИЛИ зависит от длительности экспозиции. Например, В. К. Казимирко и Н. Н. Клодченко отмечают, что облучение продолжительностью 10 мин. *in vivo* и *in vitro* способствует улучшению метаболизма и росту функциональной активности нейтрофилов, а более длительная экспозиция снижает функциональные возможности клеток.

По данным И. М. Байбекова и М. И. Байбековой, 60-минутное внутривенное лазерное облучение крови вызывает необратимые изменения: отслоение эндотелиоцитов от базальной мембраны и их десквамацию.

Следует отметить, что первые лазеры, допущенные Министерством здравоохранения к использованию в клинической практике, работали в непрерывном режиме и характеризовались средней мощностью 2–15 мВт. Однако по мере развития лазерных медицинских технологий, а также появления на лазерном рынке доступных и надежных полупроводниковых лазеров красной и ближней инфракрасной областей спектра все больший интерес со стороны специалистов начал проявляться к лазерным источникам мощностью 20–50 мВт, а затем и 100–500 мВт. Заслуживает быть отмеченным тот факт, что еще 5–6 лет тому назад терапевтическая аппаратура с мощностью излучения на выходе 500 мВт практически не производилась и магнитолазерный аппарат «Сенс» (совместная разработка Института физики им. Б. И. Степанова Национальной академии наук Беларуси и ПК «Люзар») был одним из первых в данном классе терапевтических аппаратов.

Современные лазерные терапевтические аппараты, как западного, так и отечественного производства, обеспечивают возможность воз-

действия лазерным излучением в непрерывном, модулированном и импульсном режимах.

Как было сказано выше, первые результаты, свидетельствующие о биологическом стимулирующем действии НИЛИ, были получены с использованием гелий-неонового лазера ( $\lambda = 632,8$  нм). В настоящее время лазеры данного типа в новых разработках НИЛИ практически не используются, так как по совокупности своих медико-технических характеристик значительно уступают лазерным диодам (LD).

К достоинства LD следует отнести: а) возможность выбора длин волн в широком диапазоне; б) компактность; в) отсутствие высокого напряжения в источниках питания; г) легко реализуемая возможность создания аппаратуры, не требующей заземления; д) малая потребляемая мощность (что делает возможным работу от встроенного автономного источника питания – малогабаритных аккумуляторов); е) легко реализуемая возможность изменения воздействующих параметров; ж) надежность и долговечность; з) сравнительно низкая цена и коммерческая доступность.

Литература по вопросам влияния лазерного излучения на различные биообъекты насчитывает к настоящему времени более 10 тыс. публикаций. Наиболее острой темой дискуссий неизменно остаются первичные механизмы наблюдаемых феноменов.

Рассмотрим наиболее вероятные из обсуждавшихся в литературе первичных (физико-химических) эффектов действия НИЛИ на биообъекты.

1. Согласно фотоакцепторной гипотезе, лазерное излучение активизирует некоторые ферменты-акцепторы, спектр поглощения которых совпадает с его энергетическим спектром. Считают, что такими акцепторами являются каталаза, супероксиддисмутаза, НАДФН-дисмутаза, протопорфирин, а также фермент дыхательной цепи – цитохром-с-оксидаза. Так, например, была высказана гипотеза, что облучение приводит к ускорению переноса электронов в дыхательные цепи благодаря изменению в редокс-свойствах ее компонентов при фотовозбуждении их электронных состояний. В связи с изменениями в редокс-состояниях хромофора  $S_{2B}$ , являющегося частью каталитического центра цитохром-с-оксидазы, предполагается, что вследствие облучения уменьшается количество связанного в каталитическом центре NO. В физиологических условиях NO служит модулятором (ингибитором) активности цитохром-с-оксидазы и связывается именно с хромофором  $S_{2B}$ . В условиях патологии увеличивается выделение NO и, соответственно, вероятность ингибирования цитохром-с-оксидазы повышается. В та-

ких условиях увеличение дыхательной активности клетки вследствие облучения может играть важную роль с точки зрения ожидаемых положительных результатов НИЛИ.

В связи с тем, что фотоакцепторы являются активными участниками различных процессов в организме, их взаимодействие с лазерным излучением, сопровождающееся различными структурно-функциональными изменениями, может приводить к многообразным эффектам на уровне целостного организма – стимуляции биоэнергетических процессов, повышению мощности систем адаптации.

2. С. Д. Захаров с соавторами большую роль в механизмах действия НИЛИ отводит генерации активных форм кислорода (АФК), которые индуцируют окислительные процессы.

Действие АФК зависит от их концентрации. Положительный эффект наблюдается при образовании небольших количеств АФК, что имеет место при малых дозировках лазерного облучения с определенной длиной волны. Отмечают следующие основные эффекты, вызываемые генерацией АФК: стимуляция пролиферации и других функций клеток, увеличение внутриклеточного уровня  $Ca^{++}$ , активация окислительно-восстановительных реакций, синтеза АТФ, ДНК и др.

3. Очень многие стороны стимулирующего действия лазерного излучения могут быть объяснены с позиции вызываемых им конформационных изменений биополимеров (белки, липиды, мембраны и ферменты). Это обусловлено тем, что конформация (пространственная структура) и конформационные перестройки биополимеров лежат в основе регуляции обменных процессов и молекулярных механизмов рецепции, транспорта, зрения, мышечного сокращения.

Фотофизический механизм изменений пространственной структуры компонентов клетки с жидкокристаллическим характером упорядочения, ответственных за регуляцию метаболических процессов (макромолекул ферментов, мембран), может заключаться в переориентации отдельных высокоупорядоченных анизотропных участков (доменов) указанных компонентов в результате взаимодействия электрического поля световой волны с индуцированным (этой волной) интегральным электрическим диполем домена. Указанный механизм представляет собой оптический эффект Керра и должен наблюдаться для молекул, характеризующихся анизотропией поляризуемости.

Изменение конформации биомолекул может сказываться на активности ферментов биохимических реакций, транспорте питательных веществ, образовании свободных форм веществ, что может объяснить многие стороны стимулирующего действия НИЛИ.

Изменение конформации возможно под действием внешнего электромагнитного излучения (ЭМИ). В случае когда ЭМИ попадает в полосу сильного поглощения молекул человеческого организма и поглощение это значительное, оно может вызвать «денатурированный переход», поэтому гамма-излучение, рентген, УФ-терапия, СВЧ-физиотерапия и лечение синим светом весьма критичны к дозе и могут вызвать нежелательную деструкцию тканей, например ожог. И наоборот, низкоинтенсивное излучение, попадающее в полосу слабого поглощения молекул, не может привести к деструкции, перегреву, разрушению биообъекта, но в то же время вызывает функциональные переходы, которые очень сильно влияют на деятельность живой клетки. В таком диапазоне работают низкоинтенсивные источники ЭМИ, используемые в лазерной терапии.

4. По данным А. Н. Рубинова и А. А. Афанасьева, из нерезонансных механизмов поглощения и действия лазерного излучения наибольшего внимания заслуживает механизм, обусловленный действием градиентных сил на биологические органеллы, клетки и другие образования микронных размеров вследствие формирования лазерным излучением спекл-структуры за счет интерференции падающего луча с отраженными и рассеянными (на неоднородностях ткани) лучами.

В результате нерезонансного дипольного взаимодействия электрической компоненты света со светоиндуцированным дипольным моментом биологических микрочастиц возникают градиентные силы, способные оказывать биологическое действие.

Результаты многочисленных исследований показывают, что ни одна из существующих гипотез не раскрывает полностью механизма возникновения биологической реакции на лазерное излучение, а лишь демонстрирует различные стороны общего ответа организма на разных уровнях его реализации.

Многие предположения о первичных механизмах действия НИЛИ еще недостаточно подтверждены, даже в условиях *in vitro*, что указывает на необходимость и перспективность дальнейших исследований в этом направлении.

Таким образом, лазерные технологии стали сегодня неотъемлемым элементом технической инфраструктуры, а НИЛИ вошло в арсенал современной медицины всех промышленно развитых стран мира как лечебное и терапевтическое средство. Перспективными являются исследования, посвященные применению НИЛИ в сельском хозяйстве, в том числе в животноводстве.

Первые исследования по использованию НИЛИ в животноводстве были выполнены более 30 лет назад Н. В. Михайловой и др. В ходе данных исследований был сделан вывод о том, что облучение куриных яиц светом гелий-неонового лазера с длиной волны  $\lambda = 632,8$  нм положительно влияет на показатели вывода и жизнеспособность цыплят.

Дальнейшими исследованиями Б. Ф. Бессарабова и Е. Б. Петрова установлены ускоренный темп эмбриогенеза, повышение уровня гемоглобина в крови и показателей естественной резистентности молодняка цыплят, которые подвергались воздействию лазерного облучения на ранних стадиях эмбрионального развития.

Результаты исследований В. П. Иноземова и др. в области использования НИЛИ в ветеринарии показали высокую эффективность метода лазерной терапии при артритах у лошадей и крупного рогатого скота, при лечении хронического и субклинического маститов у КРС, по сравнению с медикаментозным.

Е. Ю. Смертина и др. установили, что инфракрасное ( $\lambda = 940$  нм) и красное ( $\lambda = 660$  нм) оптическое излучение при частотах модуляции 0, 5, 50, 100, 250, 500, 1 000, 3 000, 5 000, 25 000 Гц оказывает антимикробное действие в виде снижения скорости роста культуры золотистого стафилококка, повышает естественную резистентность организма больных коров, обеспечивает выздоровление коров без медикаментозного вмешательства при асептическом и субклиническом маститах.

В работе Т. Н. Болтушкиной и Д. В. Шестакова по изучению применения НИЛИ инфракрасной области спектра с длиной волны  $\lambda = 0,89-0,99$  мкм было отмечено увеличение живой массы телят, подвергнутых воздействию лазерного излучения, по сравнению с контрольной группой. Указанный эффект авторы объясняют увеличением количества инфузорий в рубцовой жидкости животных, подвергнутых излучению.

По данным А. А. Музыки с соавторами, воздействие НИЛИ инфракрасной области спектра в сочетании с магнитным полем в раннем постнатальном онтогенезе на биологически активные точки (БАТ) телят способствует повышению уровня естественной резистентности и скорости роста их.

Результаты исследований А. Ф. Трофимова с соавторами показали, что стимуляция БАТ вымени при раздое первотелок НИЛИ инфракрасной области спектра с длиной волны  $\lambda = (0,89 \pm 0,02)$  мкм в сочетании с магнитным полем приводила к увеличению молочной продуктивности первотелок, опытные группы оказались лучше подготовлен-

ными к интенсивной секреции молока, что повышало эффективность технологий раздоя первотелок. Кроме того, указанный физический фактор оказывал влияние на длительность латентного периода рефлекса молокоотдачи. Похожие результаты регистрировали при воздействии НИЛИ красной области спектра ( $\lambda = (0,67 \pm 0,02)$  мкм) в сочетании с магнитным полем.

По данным Д. В. Малашко, облучение вымени коров комбинированным многоцветным НИЛИ в красном ( $\lambda = (0,67 \pm 0,02)$  мкм) и синем ( $\lambda = (0,47 \pm 0,03)$  мкм) спектральном диапазонах в сочетании с постоянным магнитным полем контактно-компрессионным методом сканирования при субклиническом мастите вызывает на 2–3-й день интенсивное снижение соматических клеток в молоке с восстановлением функции молочной железы на 4,5–5,5-й день сканирования.

Исследованиями А. Ф. Трофимова с соавторами установлено, что воздействие НИЛИ красной области спектра ( $\lambda = (0,67 \pm 0,02)$  мкм) на длиннейшие мышцы поясницы и груди значительно повышало живую массу и среднесуточный прирост поросят. Кроме того, авторы отмечают увеличение в опытной группе содержание гемоглобина, эритроцитов и общего белка в крови, по сравнению с контрольными значениями.

В. В. Малашко с соавторами указывают на способность НИЛИ красной области спектра ( $\lambda = (0,67 \pm 0,02)$  мкм) при облучении длиннейшей мышцы спины стимулировать морфогенетические и метаболические процессы в соматической мускулатуре, увеличивая объем саркоплазмы и массу сократительных структур – миофибрилл.

Таким образом, применение НИЛИ в животноводстве и ветеринарии способно существенно повысить эффективность технологии птицеводства, свиноводства и крупного животноводства за счет улучшения хозяйственно полезных признаков животных. При этом перспективными являются исследования, посвященные применению НИЛИ в отрасли животноводства, а именно в рыбоводстве.

В настоящее время все больший интерес исследователей проявляется к коррекции и стимулированию роста и развития гидробионтов с помощью различных физических факторов, особенно в условиях аквакультуры.

Так, целым рядом исследователей отмечена возможность с помощью света и различных режимов и способов освещения оказывать стимулирующее действие на рыбоводно-биологические показатели различных видов рыб. В исследованиях А. Б. Ручина, в которых изуча-

лось влияние фотопериода на рост, физиологические и гематологические показатели сибирского осетра (*A. baeri*), указывается, что максимальная скорость роста молодежи наблюдалась при 12-, 16- и 24-часовом световом дне на фоне усиления интенсивности дыхания, повышения суммарного потребления и конвертирования пищи. Круглосуточное затемнение вызывало достоверное снижение указанных показателей. При оптимальных режимах фотопериода гематологические показатели находились в норме. При отсутствии света наблюдались четко выраженные нейтрофилия и лейкопения. В оптимальных для роста рыб и земноводных режимах светового фактора увеличиваются количество лимфоцитов и эритроцитов, концентрация гемоглобина, изменяется биохимический состав сывороточных белков и улучшаются морфофизиологические индексы.

Ю. А. Ивановский в исследованиях эффекта радиационной стимуляции при действии больших и малых доз ионизирующего облучения установил стимулирующее действие  $\gamma$ -облучения при больших дозах радиации на различные биологические процессы у *Artemia salina*, а также влияние сверхмалых доз  $\gamma$ -радиации на двигательную активность ресничек мерцательного эпителия у животных и растений различных таксономических групп. Вместе с тем Ю. А. Ивановский отмечает, что при больших дозах радиационная стимуляция сопровождается процессами лучевого поражения у животных и растений различных таксономических групп.

Группа авторов во главе с М. М. Радько, воздействуя электромагнитным излучением сверхвысокой частоты, переменного однородного магнитного поля и омагниченной воды на оплодотворенную икру и эмбрионы белого амура, наблюдала стимулирующее влияние на эмбриональное развитие и выживаемость личинок растительноядных рыб.

В исследованиях влияния слабых импульсных магнитных полей (СИМП) на развитие рыб А. Г. Селюков и др. указывают, что под воздействием указанного физического фактора у личинок стерляди (*A. ruthenus*) наблюдались существенные расхождения в сформированности гонад и признаки начала цитологической дифференцировки пола. Результаты, полученные с применением СИМП на сибирском осетре (*A. baeri*), свидетельствуют о повышенном, в сравнении с контролем, уровне сбалансированности морфометрических параметров и более интенсивном развитии репродуктивной системы, отчетливо проявляющихся в пятимесячном возрасте. Кроме того, личинки тугуна

(*Coregonus tugun*), обработанные на этапе вылупления СИМП, приобрели токсикорезистентные характеристики, которые способствовали их продолжительному существованию в условиях нефтяного загрязнения без патоморфологических изменений органов, отвечающих за важнейшие функции организма.

Д. Ю. Шкуратов и др. проводили исследования влияния низкоинтенсивного лазерного ( $\lambda = 633$  нм) и сверхвысокочастотного электромагнитного (450 МГц) излучений и их сочетания на эмбрионы и личинки морского ежа (*Strongylocentrotus intermedius*). Установлено, что облучение сверхвысокочастотным излучением оказывает повреждающее воздействие на эмбрионы и личинки морского ежа. Воздействие НИЛИ после сверхвысокочастотного излучения смягчало повреждающее действие, что способствовало повышению выживаемости личинок.

Таким образом, исследования многих ученых направлены на изучение влияния различных физических факторов на рост и развитие гидробионтов. В то же время актуальными являются исследования применения низкоинтенсивного лазерного излучения в рыбоводстве. К сожалению, работы, посвященные применению НИЛИ в рыбоводстве, немногочисленны.

В первых исследованиях влияния лазерного излучения на развитие рыб в качестве источника излучения использовались гелий-неоновые лазеры с длиной волны  $\lambda = 632,8$  нм.

А. Б. Узденский и О. А. Воробьева в исследованиях влияния гелий-неонового лазерного излучения красной области спектра ( $\lambda = 632,8$  нм) с плотностью мощности 3–4 мВт/см<sup>2</sup> и длительностью экспозиции 1–30 мин на оплодотворенную икру севрюги (*A. stellatus*), азовского и черноморского осетров (*A. gueldenstaedti*) установили, что НИЛИ оказывало как отрицательное, так и положительное влияние на жизнедеятельность икры и личинок осетровых рыб в зависимости от длительности экспозиции и стадии эмбрионального развития, на которой осуществлялось воздействие. Отрицательный эффект проявлялся в замедлении и снижении выклева предличинок, уменьшении выживаемости личинок, увеличении частоты морфологических нарушений. В то же время отмечены некоторые незначительные положительные эффекты: снижение процента водянок и аномалий обонятельного органа, увеличение размерно-весовых показателей.

В исследованиях влияния лазерного излучения на раннее развитие вьюна (*Misgurnus fossilis*) при воздействии на неоплодотворенную

икру гелий-неоновым НИЛИ ( $\lambda = 632,8$  нм) красной области спектра О. В. Аверьянова и др. наблюдали, в зависимости от времени экспозиции (30–360 с) и плотности мощности (0,1–11,5 мВт/см<sup>2</sup>), значительное увеличение выживаемости эмбрионов и размерно-весовых показателей предличинок в опытных группах. В облученных партиях икры на всех этапах раннего эмбриогенеза выявилась синхронизация темпа развития отдельных зародышей. В опытных группах наблюдалось значительное уменьшение аномалий эмбрионального развития.

Сотрудники Института рыбного хозяйства Беларуси во главе с В. В. Кончицом в своих исследованиях указывали на возможность повышения выживаемости икры в процессе инкубации и увеличения выхода личинок карпа (*Cyprinus carpio*) при воздействии на неоплодотворенную икру излучением гелий-неонового лазера ( $\lambda = 632,8$  нм) при плотности мощности излучения 0,4 мВт/см<sup>2</sup> и времени экспозиции 60 с.

Вместе с тем оставался вопрос о наиболее благоприятной стадии эмбрионального развития, воздействуя на которой лазерным излучением можно ожидать максимальный стимулирующий эффект.

В своих исследованиях А. Б. Узденский и О. А. Воробьев отмечали, что стимулирующий эффект на размерно-весовые показатели молоди осетровых вызывало облучение оплодотворенной икры лазерным излучением на 24-й стадии эмбрионального развития. Эти результаты были подтверждены исследованиями У. Г. Г. Магомедовой, которая установила, что 24-я стадия эмбрионального развития осетровых рыб является наиболее благоприятной для воздействия лазерным излучением.

Как известно, эмбриональное развитие рыб характеризуется многократным увеличением массы зародыша и скорости дыхания, а также значительным усложнением структуры икринки. На самых ранних этапах эмбрионального развития (сразу после оплодотворения) это, по существу, одна клетка, которая к окончанию данного периода превращается в высокодифференцированный и крайне гетерогенный по своей структуре и составу организм, отдельные части которого (ткани и органы) имеют свои специфические черты энергетического обмена. Эти общие особенности периода эмбрионального развития накладывают отпечаток на характер энергетического обмена и его регуляцию на данных стадиях. Поэтому воздействие на эмбриональное развитие различными факторами способно существенно изменить весь пост-эмбриогенез.

Эмбриональное развитие осетровых рыб включает в себя такие основные этапы, как оплодотворение (стадии 1–3), дробление (стадии 3–12), гастрюляция (стадии 13–18), развитие от конца гастрюляции до начала пульсации сердца (нейруляция: стадии 19–23; развитие от смыкания нервных валиков до начала пульсации сердца: стадии 24–28), развитие зародыша от начала пульсации сердца до освобождения из оболочек (стадии 29–36).

По данным Т. А. Детлаф и др., стадия 24 – это стадия появления глазных выростов и утолщения переднего конца выделительной системы. На этой стадии образуются глазные выросты, зачатки перепончатых лабиринтов, зачатки железы вылупления, зачатки первой пары висцеральных дуг. В передней части закладок выделительной системы образуется утолщение, представляющее собой зачатки предпочки, собирающего канала и верхней части выводных протоков (предпочечных протоков). Данный период эмбрионального развития характеризуется изменением формы тела зародыша, обособлением хвостового отдела, формированием отделов головного мозга, закладкой органов чувств (обонятельных мешков, глаз и перепончатых лабиринтов), появлением зачатков гипофиза, эпифиза, железы вылупления, закладкой висцеральных дуг, обособлением и дифференцировкой предпочки, образованием сердца и кровеносных сосудов, закладкой жаберных карманов и возникновением зачатков печени. Происходит начало дифференцировки тканей (образуются мышечные волокна, начинается вакуализация хорды, появляются кровяные клетки).

На данной стадии эмбрионального развития зародыш неподвижен и не изменяет своего положения в оболочках. Изменение внешней формы тела зародыша характеризуется рядом особенностей, связанных с большим количеством желтка в клетках стенки кишки и в связи с этим относительно большими размерами брюшного отдела тела. Головной отдел у зародышей осетровых, как и у костных гоноидов и костистых рыб, долгое время остается необособленным и лежит на поверхности брюшного отдела тела, только постепенно отделяясь от него путем образования кожной складки. Хвост, так же как и голова, обособляется путем образования кожной складки, но несколько раньше. Одновременно происходит удлинение осевых органов, причем заметно удлиняется головной отдел, а в конце этапа начинается быстрый рост хвостового отдела. Последний начинает обособляться вскоре после замыкания нервной трубки: нерасчлененная осевая мезодерма, примыкающая к заднему концу нервной трубки, несколько стягивается к среднеспин-

ной плоскости, утолщается и приподнимается над поверхностью зародыша, образуя вместе с концом нервной трубки первый зачаток хвоста, который затем непрерывно удлиняется. У заднего конца хвостового зачатка эпителий образует углубление, хвостовую складку, и таким образом хвостовой конец отделяется от брюшного отдела.

Кроме стадии эмбрионального развития, оставался открытым вопрос о наиболее оптимальной плотности мощности воздействующего физического фактора. В исследованиях влияния гелий-неонового лазерного излучения красной области спектра ( $\lambda = 632,8$  нм) на морфометрические и биохимические показатели в процессе развития осетровых рыб У. Г.-Г. Магомедова пришла к выводу, что плотность мощности в  $2,92$  мВт/см<sup>2</sup> оказывает стимулирующий эффект на выживаемость, выход предличинок и личинок, способствует увеличению линейно-весовых показателей.

В исследованиях сотрудников Института физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси указывается, что плотность мощности в  $3,0$  мВт/см<sup>2</sup> оказывает максимальный стимулирующий эффект при облучении клеток животных в условиях *in vitro*.

Таким образом, попытки использования лазерного излучения красной области спектра (гелий-неоновый лазер,  $\lambda = 632,8$  нм) в рыбоводстве показали, что его воздействие на икру осетра и севрюги либо оказывает (в зависимости от дозовой нагрузки и стадии эмбрионального развития) слабо выраженное стимулирующее влияние на выживаемость и жизнеспособность мальков и их размерно-весовые показатели, либо действие на эмбриогенез рыб имеет негативный характер. Более выраженное стимулирующее действие излучение гелий-неонового лазера оказывает на эмбриональное развитие вьюна.

Разнообразие реакций эмбрионов, по-видимому, связано с различной зависимостью фоточувствительности икры от ряда факторов: спектральных и энергетических параметров освещения, оптических характеристик икринок, эволюционно выработанных адаптаций, а также стадий эмбриогенеза и внешних условий. При этом оптические характеристики икры вьюна, сиговых или карповых рыб, желто-оранжевая окраска которой определяется главным образом наличием каротиноидов и цитохромов, значительно отличаются от спектра поглощения икры осетровых рыб из-за наличия меланина, придающего ей черную окраску. Меланиновые пигменты помимо функций тушителя синглетного кислорода, ингибитора свободно радикальных реакций, химического протектора и т. п. выступают также и в роли своеобраз-

ного оптического экрана для излучения ультрафиолетовой и видимой областей спектра, значительно снижая его интенсивность и фотобиологическую активность.

Поиск наиболее оптимального спектрального диапазона воздействующего лазерного излучения является актуальной задачей, поставленной перед современными исследователями.

В последние годы все больше исследователей в области ихтиологии, гидробиологии и аквакультуры уделяют внимание изучению влияния НИЛИ инфракрасной области спектра. Так, С. Ю. Крутик указал на возможность повышения выживаемости предличинок и молоди тетры-плотвички (*Hemigrammus caudovittatus*) при воздействии импульсным инфракрасным лазерным излучением ( $\lambda = 890$  нм).

Э. К. Попова при изучении стабилизации фенотипического и генотипического разнообразия в аквакультуре лососевых путем кратковременного воздействия НИЛИ отмечала, что воздействие на рыб в раннем онтогенезе лазерным или магнитно-инфракрасно-лазерным излучением в определенном дозовом интервале способствует сохранению генетического разнообразия искусственно выращиваемой молоди семги.

Как следует из представленных выше данных, икра и эмбрионы рыб, в том числе осетровых, являются удобной моделью для исследования биологических механизмов действия факторов физической природы, а именно НИЛИ.

## **2.2. Способ стимуляции размерно-весовых показателей молоди осетровых рыб**

Сущность предлагаемого способа заключается в следующем. Увлажненную оплодотворенную икру возвратного гибрида бестера на стадии органогенеза подвергают воздействию светодиодного излучения. Облучение осуществляют с помощью аппарата «Sturgeon-Red», созданного на базе сверхъярких светодиодов. Технические характеристики аппарата позволяют производить воздействие на икру как неполяризованным, так и линейно поляризованным излучением в непрерывном режиме с длиной волны  $\lambda = (630 \pm 10)$  нм. Для поляризации излучения на выходе излучателя устанавливается поляроидная пленка. Излучатель аппарата располагают на расстоянии  $l = (100 \pm 10)$  мм таким образом, чтобы размер светового пятна соответствовал размеру монослоя облучаемой икры. Мощность излучения  $W$  на выходе излучателя контролируют с помощью измерителя средней мощности ИМО-3С.

Плотность мощности (в мВт/см<sup>2</sup>) излучения, воздействующего на монослой, определяют по формуле  $P = W / S$ , где  $W$  – средняя мощность излучения, мВт;  $S$  – площадь светового пятна на уровне монослоя икры, см<sup>2</sup>. Выравнивание мощности излучения, воздействующего на икру в случае использования неполяризованного и поляризованного излучения, осуществляется путем изменения тока, протекающего через светодиод.

Для определения оптимального времени воздействия, оказывающего максимальный стимулирующий эффект на размерно-весовые показатели молоди осетровых рыб, облучение икры проводят в течение 30, 60, 90, 180, 300, 600 с. Полученные зависимости стимулирующего действия от времени облучения поляризованным и неполяризованным излучением светодиодного источника с длиной волны  $\lambda = (630 \pm 10)$  нм в непрерывном режиме при плотности мощности излучения  $P = (2,9 \pm 0,2)$  мВт/см<sup>2</sup> в отношении длины 50-дневной молоди осетровых рыб представлены на рис. 103, а в отношении массы – на рис. 104. На рис. 103 по оси абсцисс отложено время облучения в секундах, а по оси ординат – величина стимулирующего действия излучения в отношении длины рыб, определяемая по формуле,  $\gamma_d = (L_o / L_k) 100 \%$ , где  $L_o$  – длина молоди возвратного гибрида бестера, полученной из эмбрионов, облученных на 24-й стадии развития светодиодным источником излучения красной области спектра, т. е. опытная группа, мм;  $L_k$  – длина молоди возвратного гибрида бестера, эмбрионы которой не подвергались воздействию излучения, т. е. контрольная группа, мм. При этом кривая 1 отражает зависимость стимулирующего действия в отношении длины рыб в процентах к контролю при облучении поляризованным излучением, а кривая 2 – неполяризованным излучением.

На рис. 104 по оси абсцисс отложено время облучения в секундах, а по оси ординат – величина стимулирующего действия излучения в отношении массы рыб, определяемая по формуле,  $\gamma_m = (M_o / M_k) 100 \%$ , где  $M_o$  – масса молоди возвратного гибрида бестера, полученной из эмбрионов, облученных на 24-й стадии развития светодиодным источником излучения красной области спектра, т. е. опытная группа, мг;  $M_k$  – масса молоди возвратного гибрида бестера, эмбрионы которой не подвергались воздействию излучения, т. е. контрольная группа, мг. При этом кривая 1 отражает зависимость стимулирующего действия в отношении массы рыб в процентах к контролю при облучении поляризованным излучением, а кривая 2 – неполяризованным излучением.

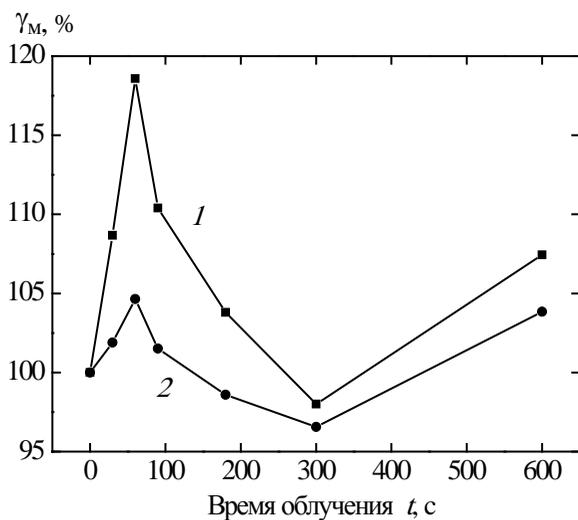


Рис. 103. Влияние светодиодного излучения на длину молоди осетровых рыб

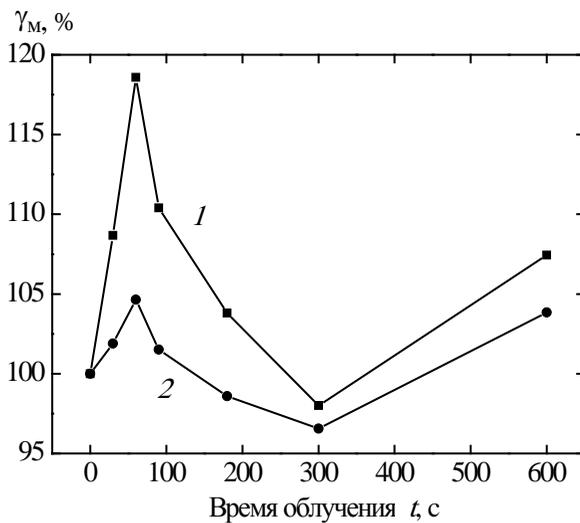


Рис. 104. Влияние светодиодного излучения на массу молоди осетровых рыб

Контрольные (интактные) образцы икры выдерживают в тех же условиях, что и опытные. Количество икринок в опытной и контрольной группах составляет 300 шт. Статистическую обработку полученных результатов проводят с помощью статистических приложений компьютерных программ Microsoft Office Excel 2003 и Origin 7.5. Температура икры в момент ее облучения лазером (а также в контрольных образцах) составляет  $(16 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .

После процедуры облучения икру помещают для дальнейшего инкубирования в уменьшенные образцы аппаратов Вейса, в которых по достижении завершения эмбрионального развития происходит выклев предличинок. Опытные и контрольные группы содержат в отдельных аппаратах, в которых обеспечивают постоянство гидрохимических условий.

Выклюнувшихся предличинок с каждой группы переносят в отдельные пронумерованные пластиковые садки, входящие в общую систему водоснабжения осетрового завода. Плотность посадки предличинок составляет  $5000 \text{ шт/м}^2$ . В процессе выдерживания предличинок осуществляют ежедневный контроль за температурным и кислородным режимами. При переходе на активное питание плотность посадки личинок уменьшают в два раза. В дальнейшем плотность посадки уменьшают обратно пропорционально росту личинок осетровых рыб.

Кормление осуществляют искусственными и живыми кормами (науплии артемии) в соотношении 60:40 % (первые 4 недели). В последующем применяют только искусственные корма. В качестве искусственных кормов используют стартовый корм *Aller Futura* фирмы *Aller aqua* (№ крупки 000, 00, 0; сырой протеин – 64 %, сырой жир – 9 %, углеводы – 7 %). Рационы кормления соответствуют рекомендациям производителя.

При достижении молодью 50-суточного возраста определяют размерно-весовые показатели (масса, мг; длина, мм). Для изучения данных показателей личинок и молодь взвешивают на электронных весах (цена деления 0,01 мг) и измеряют линейкой (от конца рыла до развилки хвостового плавника).

Установлено, что воздействие на эмбрионы осетровых рыб на 24-й стадии излучением светодиодного источника при плотности мощности воздействующего излучения  $P = (2,9 \pm 0,2) \text{ мВт/см}^2$  приводит к стимуляции их длины и массы как при облучении поляризованным, так и неполяризованным излучением. Однако при облучении линейно поляризованным излучением при оптимальных условиях воздействия стимулирующий эффект значительно выше, чем неполяризованным.

Вышесказанное подтверждается данными, представленными в табл. 2, 3. При этом в табл. 2 приведены значения средней длины, а в табл. 3 средней массы 50-дневной молоди осетровых, эмбрионы которой на стадии органогенеза не подвергались (контрольная группа) или подвергались (опытная группа) воздействию поляризованного и неполяризованного излучения светодиодного источника красной области спектра с длиной волны  $\lambda = (630 \pm 10)$  нм в непрерывном режиме при плотности мощности воздействующего излучения  $P = (2,9 \pm 0,2)$  мВт/см<sup>2</sup>.

**Таблица 2. Показатели средней длины 50-дневной молоди осетровых рыб, эмбрионы которой на 24-й стадии развития подвергались воздействию поляризованного и неполяризованного излучения красной области спектра в течение различного времени**

Режим воздействия	Время облучения, с	Средняя масса L, мм	Величина стимулирующего действия $\gamma_d$ , %	Достоверность отличий от контроля
Контроль	0	47,0 ± 0,5	100	–
Поляризованное излучение	30	49,2 ± 0,4	104,7 ± 0,8	P < 0,001
	60	51,9 ± 0,4	110,5 ± 0,9	P < 0,001
	90	50,7 ± 0,4	107,8 ± 0,8	P < 0,001
	180	48,5 ± 0,4	103,1 ± 0,7	P < 0,005
	300	46,0 ± 0,3	97,9 ± 0,6	–
	600	50,1 ± 0,4	106,6 ± 0,9	P < 0,001
Неполяризованное излучение	30	48,2 ± 0,4	102,5 ± 0,8	–
	60	49,5 ± 0,3	105,3 ± 0,7	P < 0,001
	90	48,7 ± 0,4	103,7 ± 0,7	P < 0,010
	180	46,4 ± 0,3	98,7 ± 0,7	–
	300	45,4 ± 0,3	96,6 ± 0,6	P < 0,010
	600	49,0 ± 0,4	104,4 ± 0,9	P < 0,010

**Таблица 3. Показатели средней массы 50-дневной молоди осетровых рыб, эмбрионы которой на 24-й стадии развития подвергались воздействию поляризованного и неполяризованного излучения красной области спектра в течение различного времени**

Режим воздействия	Время облучения, с	Средняя масса M, мг	Величина стимулирующего действия $\gamma_m$ , %	Достоверность отличий от контроля
1	2	3	4	5
Контроль	0	566,3 ± 9,5	100	–

Окончание табл. 3

1	2	3	4	5
Поляризованное излучение	30	615,4 ± 16,2	108,7 ± 2,9	P < 0,01
	60	671,5 ± 20,9	118,6 ± 3,7	P < 0,001
	90	625,2 ± 15,4	110,4 ± 2,7	P < 0,01
	180	587,8 ± 13,1	103,8 ± 2,3	–
	300	555,0 ± 10,4	98,0 ± 1,8	–
	600	608,4 ± 14,9	107,4 ± 2,6	P < 0,05
Неполяризованное излучение	30	577,0 ± 13,0	101,9 ± 2,3	–
	60	592,6 ± 15,3	104,6 ± 2,7	P < 0,05
	90	574,9 ± 10,2	101,5 ± 1,8	–
	180	558,4 ± 8,4	98,6 ± 1,5	–
	300	546,8 ± 9,1	96,6 ± 1,6	–
	600	588,1 ± 11,7	103,9 ± 2,1	–

Из представленных данных следует, что облучение эмбрионов осетровых рыб на стадии органогенеза приводит к увеличению размерно-весовых показателей молоди. Так, если в контрольной (необлученной) группе средняя длина 50-дневных особей  $L_k$  составляет  $(47,0 \pm 0,5)$  мм, то для группы рыб, эмбрионы которой подвергались воздействию поляризованного излучения с длиной волны  $\lambda = (630 \pm 10)$  нм при плотности мощности  $P = (2,9 \pm 0,2)$  мВт/см<sup>2</sup> в течение 60 с,  $L_o = (51,9 \pm 0,4)$  мм, т. е. величина стимулирующего действия  $\gamma_d$  составляет  $(110,5 \pm 0,9)$  %, достоверность отличий от контроля  $P < 0,001$ . При  $t = 30$  с  $L_o = (49,2 \pm 0,4)$  мм,  $\gamma_d = (104,7 \pm 0,8)$  %,  $P < 0,001$ , а при  $t = 90$  с  $L_o = (50,7 \pm 0,4)$  мм,  $\gamma_d = (107,8 \pm 0,8)$  %,  $P < 0,001$ . Как видно из рис. 103 (кривая 1), дальнейшее увеличение времени воздействия приводит к снижению стимулирующего действия поляризованного излучения светодиодного источника в отношении длины 50-дневной молоди.

При использовании неполяризованного излучения максимальное стимулирующее действие также наблюдается при времени облучения, равном 60 с. Однако, как следует из табл. 2, в этом случае  $L_o = (49,5 \pm 0,3)$  мм, а величина стимулирующего действия  $\gamma_d$  составляет  $(105,3 \pm 0,7)$  %,  $P < 0,001$ . При времени воздействия неполяризованным излучением  $t$ , равном 30 с,  $L_o = (48,2 \pm 0,4)$  мм,  $\gamma_d = (102,5 \pm 0,8)$  %, а при  $t = 90$  с  $L_o = (48,7 \pm 0,4)$  мм,  $\gamma_d = (103,7 \pm 0,7)$  %,  $P < 0,01$ . Согласно рис. 103 (кривая 2), дальнейшее увеличение времени воздействия приводит к снижению стимулирующего действия неполяризованного излучения светодиодного источника в отношении длины 50-дневной молоди.

Таким образом, максимальный стимулирующий эффект в отношении длины 50-дневной молоди осетровых рыб наблюдается при воздействии на эмбрионы поляризованным излучением светодиодного источника красной области спектра с длиной волны  $\lambda = (630 \pm 10)$  нм при плотности мощности  $P = (2,9 \pm 0,2)$  мВт/см<sup>2</sup> в течение  $(60 \pm 30)$  с. Для неполяризованного источника с теми же параметрами стимулирующее действие существенно ниже.

Аналогичная тенденция прослеживается и при контроле массы 50-дневной молоди осетровых рыб. Так, если в контрольной (необлученной) группе средняя масса 50-дневных особей  $M_k$  составляет  $(566,3 \pm 9,5)$  мг, то для группы рыб, эмбрионы которой подвергались воздействию поляризованного излучения с длиной волны  $\lambda = (630 \pm 10)$  нм при плотности мощности  $P = (2,9 \pm 0,2)$  мВт/см<sup>2</sup> в течение 60 с  $M_o = (671,5 \pm 20,9)$  мг, т. е. величина стимулирующего действия  $\gamma_m$  составляет  $(118,6 \pm 3,7)$  %, достоверность отличий от контроля  $P < 0,001$ . При времени воздействия  $t$ , равном 30 с,  $M_o = (615,4 \pm 16,2)$  мг,  $\gamma_m = (108,7 \pm 2,9)$  %,  $P < 0,01$ , а при  $t = 90$  с  $M_o = (625,2 \pm 15,4)$  мг,  $\gamma_m = (110,4 \pm 2,7)$  %,  $P < 0,01$ . Как видно из рис. 104 (кривая 1), дальнейшее увеличение времени воздействия приводит к снижению стимулирующего действия поляризованного излучения светодиодного источника в отношении массы 50-дневной молоди.

При использовании неполяризованного излучения максимальное стимулирующее действие также наблюдается при времени облучения, равном 60 с. Однако, как следует из табл. 3, в этом случае  $M_o = (592,6 \pm 15,3)$  мг, а величина стимулирующего действия  $\gamma_m$  составляет  $(104,6 \pm 2,7)$  %,  $P < 0,05$ . При  $t = 30$  с  $M_o = (577,0 \pm 13,0)$  мг,  $\gamma_m = (101,9 \pm 2,3)$  %, а при  $t = 90$  с  $M_o = (574,9 \pm 10,2)$  мм,  $\gamma_m = (101,5 \pm 1,8)$  %,  $P < 0,01$ . Согласно рис. 104 (кривая 2), дальнейшее увеличение времени воздействия приводит к снижению стимулирующего действия неполяризованного излучения светодиодного источника в отношении массы 50-дневной молоди.

Таким образом, при облучении эмбрионов осетровых рыб на стадии органогенеза излучением светодиодного источника красной области спектра с длиной волны  $\lambda = (630 \pm 10)$  нм при плотности мощности  $P = (2,9 \pm 0,2)$  мВт/см<sup>2</sup> максимальный стимулирующий эффект в отношении массы 50-дневной молоди наблюдается при использовании поляризованного излучения и времени воздействия  $t$ , равном 30–90 с.

Отличительной особенностью заявленного способа стимуляции размерно-весовых показателей молоди осетровых рыб является его

более выраженный стимулирующий эффект в сравнении с прототипом, сокращение времени воздействия, а также возможность его применения как в технологии прудового, так и промышленного осетроводства. Действительно, если для прототипа максимальный стимулирующий эффект светового воздействия для массы  $\gamma_m$  составляет 108 %, для длины  $\gamma_d$  – 104 %, то при использовании заявляемого способа  $\gamma_m = (118,6 \pm 3,7) \%$ ,  $\gamma_d = (110,5 \pm 0,9) \%$ . Следует также отметить, что поскольку источником излучения является малогабаритный светодиодный аппарат, то его применение в условиях искусственного воспроизводства и выращивания молоди осетровых рыб не создает (в отличие от прототипа) неудобств обслуживающему персоналу.

Причем для осуществления заявленного способа используется аппарат с невысоким напряжением, способный работать автономно от встроенных аккумуляторов, при этом его масса и цена в десятки раз ниже массы и стоимости лазерного источника, используемого в прототипе.

Таким образом, заявленный способ позволяет обеспечить повышение эффективности искусственного воспроизводства и выращивания осетровых рыб за счет повышения темпа прироста их массы и размеров, а также оптимизации технологии товарной аквакультуры при низкой стоимости оборудования для ее реализации.

### **2.3. Способ повышения токсикоустойчивости молоди осетровых рыб**

Задачей заявленного изобретения является повышение выживаемости потомства осетровых рыб в загрязненной промышленными отходами воде, повышение эффективности искусственного воспроизводства и выращивания молоди осетровых рыб за счет безопасного физического воздействия на эмбрионы осетровых рыб на стадии органогенеза.

Поставленная задача решается следующим образом.

При применении способа повышения токсикоустойчивости стандартной молоди рыб, основанного на воздействии внешнего фактора на эмбрионы осетровых рыб на стадии органогенеза, на эмбрионы рыб, находящихся в воде, воздействуют модулированным лазерным излучением в ближней инфракрасной области спектра с плотностью мощности излучения  $(2,9 \pm 0,02) \text{ мВт/см}^2$  и частотой модуляции 50 Гц, время облучения 30–90 с.

Сущность предлагаемого способа заключается в следующем. Увлажненную оплодотворенную икру возвратного гибрида бестера (стерлядь  $\times$  бестер ( $F_1$ )) на стадии органогенеза подвергают воздействию поляризованного лазерного излучения. Облучение осуществляют с помощью аппарата лазерного терапевтического «Сенс-815», созданного на базе полупроводникового лазера. Излучение лазера расфокусируется линзой с фокусным расстоянием  $f$ , равным 18 мм, таким образом, чтобы размер светового пятна соответствовал размеру монослоя облучаемой икры. Технические характеристики аппарата «Сенс-815» обеспечивают возможность воздействия лазерным излучением в непрерывном (частота модуляции  $F = 0$  Гц) и модулированном режимах при частоте модуляции 1, 2, 5, 10, 50 Гц. Мощность лазерного излучения  $W$  после линзы контролировалась с помощью измерителя средней мощности и энергии лазерного излучения ИМО-3С. Плотность мощности (в мВт/см<sup>2</sup>) воздействующего на монослой лазерного излучения определялась по формуле  $P = W / S$ , где  $W$  – средняя мощность лазерного излучения, мВт;  $S$  – площадь светового пятна на уровне монослоя икры, см<sup>2</sup>.

При воздействии лазерным излучением в непрерывном режиме и режиме модуляции средняя мощность излучения  $P$  составляет  $(250 \pm 5)$  мВт. Выравнивание мощности излучения в непрерывном и модулированном режимах осуществляют с панели управления аппаратом путем регулировки тока, протекающего через полупроводниковый лазер, и контролируют измерителем мощности ИМО-3С.

Для определения оптимального времени воздействия, оказывающего максимальный эффект на токсикоустойчивость стандартной молодежи осетровых рыб, облучение икры проводят в течение 30, 60, 90, 180, 300, 600 с. Полученные зависимости действия лазерного излучения ( $\gamma$ , %) от времени воздействия для различных режимов модуляции излучения представлены на рис. 105. На данном рисунке на оси абсцисс указано время облучения в секундах, а на оси ординат – величина воздействия лазерного излучения, определяемая по формуле,  $\gamma = (N_{\text{жив}} / N) 100$  %, где  $N_{\text{жив}}$  – количество выживших экземпляров молодежи после воздействия токсиканта в течение 7 сут, шт.;  $N$  – количество экземпляров молодежи в начале воздействия токсиканта, шт. При этом длительность воздействия токсиканта на протяжении 7 сут выбрана из того расчета, что к указанному временному промежутку наблюдался летальный исход (гибель) всех экземпляров молодежи контрольной группы (на эмбрионы которой на стадии органогенеза не воздействовали лазерным излуче-

нием). Кривая 1 на рис. 105 соответствует варианту воздействия на эмбрионы на стадии органогенеза непрерывным (частота модуляции  $F = 0$  Гц) инфракрасным лазерным излучением с длиной волны  $\lambda = (0,81 \pm 0,02)$  мкм при плотности мощности  $P = (2,9 \pm 0,02)$  мВт/см<sup>2</sup>. Кривая 2 получена в результате облучения эмбрионов инфракрасным лазерным излучением с длиной волны  $\lambda = (0,81 \pm 0,02)$  мкм при плотности мощности  $P = (2,9 \pm 0,2)$  мВт/см<sup>2</sup>, модулированным по интенсивности с частотой  $F = 1$  Гц; кривая 3 – с частотой модуляции  $F = 2$  Гц; кривая 4 – с частотой модуляции  $F = 5$  Гц; кривая 5 – с частотой модуляции  $F = 10$  Гц; кривая 6 – с частотой модуляции  $F = 50$  Гц.

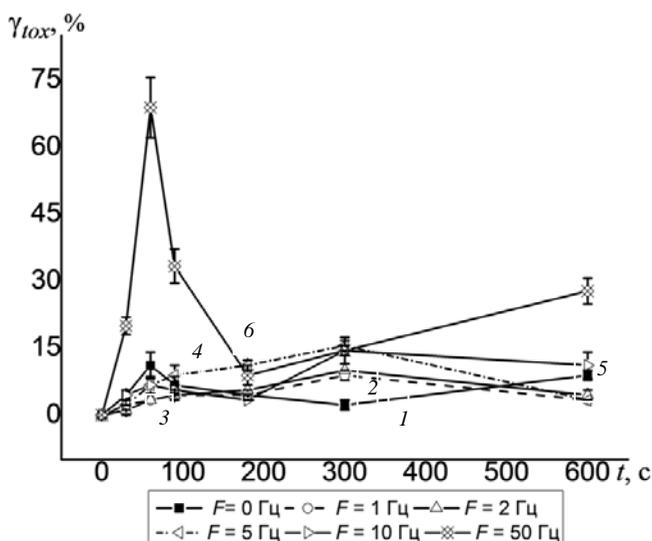


Рис. 105. Зависимость величины стимулирующего действия  $\gamma_{tox}$  НИЛИ инфракрасной области спектра по критерию токсикорезистентности 50-суточной молоди гибрида С.БС от времени экспозиции  $t$  и частоты модуляции  $F$

Контрольные (интактные) образцы икры выдерживают в тех же условиях, что и опытные. Количество икринок в опытной и контрольной группах составляет 300 шт.; количество повторностей – 3. Статистическую обработку полученных данных проводят по стандартной методике с использованием пакета Microsoft Excel. Достоверность полученных данных оценивают по критерию Стьюдента. Температура икры

в момент ее облучения лазером (а также в контрольных образцах) составляла  $(16 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .

Икру после лазерного облучения помещают в уменьшенные образцы аппаратов Вейса, предназначенные для инкубирования оплодотворенной икры, в которых по завершении эмбрионального развития происходит выклев предличинок. Опытные и контрольные группы содержат в отдельных аппаратах Вейса. В процессе инкубирования икры обеспечивается постоянство гидрохимических условий. Выключившихся предличинок переносят в отдельные садки для каждой исследуемой группы. Плотность предличинок составляет 5000 шт/м<sup>2</sup>. В период выращивания температура воды в садках  $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ . Контроль за гидрохимическим режимом осуществляют ежедневно. По достижении 50-суточного возраста (стандартного для рыбопосадочного материала осетровых рыб, выращенных в заводских условиях) над молодью проводят тесты на токсикоустойчивость. Для определения устойчивости к токсикантам используют пластиковые емкости вместимостью 5 л с аэрацией и системой поддержания температуры. В качестве токсиканта используют сульфат меди в концентрации 0,1 мг/л.

Установлено, что воздействие на эмбрионы осетровых рыб на стадии органогенеза поляризованным лазерным излучением инфракрасной области спектра с длиной волны  $\lambda = (0,81 \pm 0,02)$  мкм при плотности мощности  $P = (2,9 \pm 0,2)$  мВт/см<sup>2</sup> способно оказывать стимулирующее действие на токсикоустойчивость стандартной заводской молоди. В табл. 4 приведены значения токсикоустойчивости молоди осетровых рыб, эмбрионы которой на стадии органогенеза не подвергались (контрольная группа) и подвергались (опытная группа) воздействию поляризованного лазерного излучения инфракрасной области спектра.

**Таблица 4. Значения токсикоустойчивости к сульфату меди молоди осетровых рыб, эмбрионы которой на стадии органогенеза подвергались воздействию поляризованного лазерного излучения инфракрасной области спектра различных параметров**

Режим воздействия, частота модуляции $F$ , Гц	Время облучения, с	Токсикоустойчивость, %	Достоверность отличий от контроля
1	2	3	4
Контроль	0	0	–
Непрерывный, $F = 0$	60	$11,1 \pm 2,9$	$P < 0,010$
Модулированный, $F = 1$	300	$8,9 \pm 1,1$	$P < 0,001$
Модулированный, $F = 2$	300	$10,0 \pm 1,0$	$P < 0,001$
Модулированный, $F = 5$	300	$15,6 \pm 1,1$	$P < 0,001$
Модулированный, $F = 10$	300	$14,4 \pm 2,9$	$P < 0,001$

1	2	3	4
Модулированный, $F = 50$	30	$23,0 \pm 1,9$	$P < 0,001$
	60	$68,9 \pm 6,7$	$P < 0,001$
	90	$36,3 \pm 3,8$	$P < 0,001$
	180	$14,4 \pm 1,1$	$P < 0,001$

Из представленных данных следует, что воздействие лазерного излучения на эмбрионы осетровых рыб на стадии органогенеза приводит к значительному увеличению токсикоустойчивости молоди, что проявляется в увеличении процента выживших особей по сравнению с необлученными эмбрионами. Так, если в контрольной (необлученной) группе процент выживания под действием токсиканта  $\gamma = 0$ , то для группы рыб, эмбрионы которой подвергались воздействию модулированного лазерного облучения с частотой 50 Гц, длиной волны  $(0,81 \pm 0,02)$  мкм, плотностью мощности  $(2,9 \pm 0,2)$  мВт/см<sup>2</sup> в течение 60 с, выживаемость в условиях воздействия токсиканта составила  $(68,9 \pm 6,7)$  % (достоверность отличий от контроля  $P < 0,001$ ). То есть выживаемость молоди осетровых рыб, эмбрионы которой подвергались воздействию оптического излучения, находится на более высоком уровне, чем у необлученных особей. Отметим, что при воздействии немодулированного излучения с теми же параметрами ( $\lambda = (0,81 \pm 0,02)$  мкм,  $P = (2,9 \pm 0,2)$  мВт/см<sup>2</sup>) максимальное отличие от контроля составляет  $(11,1 \pm 2,9)$  % (достоверность отличий от контроля  $P < 0,01$ ) и наблюдается при  $t = 60$  с.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что воздействие поляризованным лазерным излучением, как в непрерывном, так и в модулированном режимах, на эмбрионы осетровых рыб на стадии органогенеза обеспечивает повышение токсикоустойчивости стандартной молоди осетровых рыб.

Величина стимулирующего эффекта токсикоустойчивости зависит от времени и режима воздействия лазерным излучением. На рис. 105 приведены зависимости величины стимулирующего эффекта  $\gamma$  от времени воздействия на эмбрионы осетровых рыб на стадии органогенеза непрерывного лазерного излучения (частота модуляции  $F = 0$  Гц), а также излучения, модулированного с частотой  $F = 1, 2, 5, 10, 50$  Гц. Как видно из рис. 105 (кривая б), максимальное повышение токсикоустойчивости наблюдается при воздействии лазерным излучением в модулированном режиме  $F = 50$  Гц в течение 60 с и составляет  $(68,9 \pm 6,7)$  % (достоверность отличий от контроля  $P < 0,001$ ). Увели-

чение или уменьшение времени воздействия в модулированном режиме  $F = 50$  Гц приводит к снижению токсикоустойчивости. Так, при времени воздействия 30 с токсикоустойчивость  $\gamma$  составляет  $(23,0 \pm 1,9) \%$ , а при  $t = 90$  с  $\gamma = (36,3 \pm 3,80) \%$ . Согласно рис. 105 (кривая б), дальнейшее увеличение времени облучения эмбрионов при  $F = 50$  Гц приводит к снижению токсикоустойчивости.

Таким образом, при облучении эмбрионов осетровых рыб на стадии органогенеза поляризованным лазерным излучением инфракрасной области спектра с длиной волны  $\lambda = (0,81 \pm 0,02)$  мкм при плотности мощности  $P = (2,9 \pm 0,2)$  мВт/см<sup>2</sup> максимальное стимулирующее действие токсикоустойчивости молоди осетровых рыб наблюдается при частоте модуляции 50 Гц и времени воздействия 30–90 с.

Стимуляция токсикоустойчивости стандартной молоди осетровых рыб наблюдается также и при воздействии непрерывным или модулированным лазерным излучением с частотой модуляции 1, 2, 3, 10 Гц. Однако, как видно из рис. 105, во всех остальных вариантах модулированного воздействия ( $F = 1$  Гц (кривая 2),  $F = 2$  Гц (кривая 3),  $F = 5$  Гц (кривая 4),  $F = 10$  Гц (кривая 5), а также непрерывного воздействия (кривая 1) стимулирующий эффект значительно ниже, чем при частоте модуляции 50 Гц.

Таким образом, максимальное повышение токсикоустойчивости при облучении оплодотворенной икры на стадии органогенеза поляризованным лазерным излучением инфракрасной области спектра с длиной волны  $\lambda = (0,81 \pm 0,02)$  мкм наблюдается для модулированного режима воздействия с частотой модуляции  $F = 50$  Гц, плотностью мощности  $P = (2,9 \pm 0,2)$  мВт/см<sup>2</sup> в течение 30–90 с.

Отличительной особенностью заявленного способа повышения токсикоустойчивости стандартной молоди осетровых рыб является его высокая производительность и применимость как в технологии прудового, так и индустриального осетроводства. Как уже отмечалось, при мощности лазера в 250 мВт за один сеанс в течение 30–90 с обрабатываемая площадь с эмбрионами составляет примерно 85 см<sup>2</sup> (в этом случае плотность мощности излучения  $P$  составляет  $(2,9 \pm 0,2)$  мВт/см<sup>2</sup>). Причем в отличие от прототипа (в котором необходим непосредственный контакт между электромагнитом и эмбрионами) заявленный способ не требует контакта между источником лазерного излучения (лазером) и объектом воздействия (эмбрионами рыб). В заявленном способе лазер может находиться на любом расстоянии от эмбрионов, а необходимая плотность мощности воздействующего излучения устанавлива-

ется путем изменения мощности излучения лазера и обрабатываемой площади с эмбрионами (размера светового пятна). При этом эффект воздействия не зависит от толщины слоя воды над поверхностью икры, поскольку вода не поглощает на указанной длине волны воздействующего излучения. Достоинством заявляемого способа является отсутствие контакта с водой у источника лазерного излучения, что значительно повышает электробезопасность выполнения процедуры стимулирующего воздействия. К тому же, в отличие от прототипа, в котором при передозировке возможен бактерицидный эффект, при использовании разработанного способа ингибирующего действия на молодь рыб не отмечается во всем исследуемом диапазоне воздействующего излучения (см. рис. 105).

Отдаленные результаты показали, что использование заявленного изобретения позволяет получить жизнестойкое потомство, обладающее более высокой устойчивостью к воздействию токсических факторов, присутствующих в среде обитания молоди рыб.

Таким образом, заявляемый способ позволяет получить жизнестойкое потомство и обеспечить повышение эффективности искусственного воспроизводства и выращивания молоди осетровых рыб, а также содействует оптимизации технологии прудового и индустриального осетроводства.

#### **2.4. Способ повышения устойчивости молоди осетровых рыб к дефициту кислорода**

Задачей заявленного изобретения является получение жизнестойкого потомства, повышение эффективности искусственного воспроизводства и выращивания осетровых рыб, а также оптимизация технологии товарной аквакультуры. Поставленная задача решается следующим образом. При применении способа повышения устойчивости стандартной молоди рыб к дефициту кислорода, основанного на стимулирующем действии оптического излучения, на стадии органогенеза на эмбрионы осетровых рыб воздействуют поляризованным лазерным излучением инфракрасной области спектра в непрерывном режиме с длиной волны  $(0,81 \pm 0,02)$  мкм при плотности мощности  $(2,9 \pm 0,2)$  мВт/см<sup>2</sup> в течение 30–90 с.

Сущность предлагаемого способа заключается в следующем. Увлажненную оплодотворенную икру возвратного гибрида бестера (стерлядь × бестер ( $F_1$ )) на стадии органогенеза подвергают воздейст-

вию поляризованного лазерного излучения. Облучение осуществляют с помощью аппарата лазерного терапевтического «Сенс-815», созданного на базе полупроводникового лазера. Излучение лазера расфокусируют линзой с фокусным расстоянием  $f$ , равным 18 мм, таким образом, чтобы размер светового пятна соответствовал размеру монослоя облучаемой икры. Технические характеристики аппарата «Сенс-815» обеспечивают возможность воздействия лазерным излучением в непрерывном (частота модуляции  $F = 0$  Гц) и модулированном режимах при частоте модуляции 1, 2, 5, 10 Гц. Мощность лазерного излучения  $W$  после линзы контролируют с помощью измерителя средней мощности и энергии лазерного излучения ИМО-3С. Плотность мощности (в мВт/см<sup>2</sup>) лазерного излучения, воздействующего на монослой, определяют по формуле  $P = W / S$ , где  $W$  – средняя мощность лазерного излучения, мВт;  $S$  – площадь светового пятна на уровне монослоя икры, см<sup>2</sup>.

При воздействии лазерным излучением в непрерывном режиме и режиме модуляции средняя мощность излучения  $P$  составляет  $(250 \pm 5)$  мВт. Выравнивание мощности излучения в непрерывном и модулированном режимах осуществляют с панели управления аппаратом путем регулировки тока, протекающего через полупроводниковый лазер, и контролируют измерителем мощности ИМО-3С.

Для определения оптимального времени воздействия, оказывающего максимальный стимулирующий эффект на устойчивость стандартной молоди осетровых рыб к дефициту кислорода, облучение икры проводят в течение 30, 60, 90, 180, 300, 600 с. Полученные зависимости стимулирующего действия лазерного излучения ( $\gamma$ , %) от времени воздействия для различных режимов модуляции излучения представлены на рис. 106. На данном рисунке по оси абсцисс отложено время облучения в секундах, а по оси ординат – величина стимулирующего действия лазерного излучения, определяемая по формуле,  $\gamma = ([O_2]_к / [O_2]_о) 100$  %, где  $[O_2]_к$  – пороговая концентрация растворенного в воде кислорода, вызывающая гибель стандартной молоди осетровых рыб, эмбрионы которой не подвергались воздействию лазерного излучения, т. е. пороговая концентрация растворенного кислорода для контрольной группы;  $[O_2]_о$  – пороговая концентрация растворенного в воде кислорода, вызывающая гибель стандартной молоди осетровых рыб, эмбрионы которой на стадии органогенеза подвергались воздействию поляризованным лазерным излучением инфракрасной области спектра, т. е. пороговая концентрация растворенного кислорода для

опытной группы. Причем кривая 1 на рис. 106 соответствует варианту воздействия на эмбрионы на стадии органогенеза непрерывным (частота модуляции  $F = 0$  Гц) инфракрасным лазерным излучением с длиной волны  $\lambda = (0,81 \pm 0,02)$  мкм при плотности мощности  $P = (2,9 \pm 0,02)$  мВт/см<sup>2</sup>. Кривая 2 получена в результате облучения эмбрионов инфракрасным лазерным излучением с длиной волны  $\lambda = (0,81 \pm 0,02)$  мкм при плотности мощности  $P = (2,9 \pm 0,2)$  мВт/см<sup>2</sup>, модулированным по интенсивности с частотой  $F = 1$  Гц; кривая 3 – с частотой модуляции  $F = 2$  Гц; кривая 4 – с частотой модуляции  $F = 5$  Гц; кривая 5 – с частотой модуляции  $F = 10$  Гц; кривая 6 – с частотой модуляции  $F = 50$  Гц.

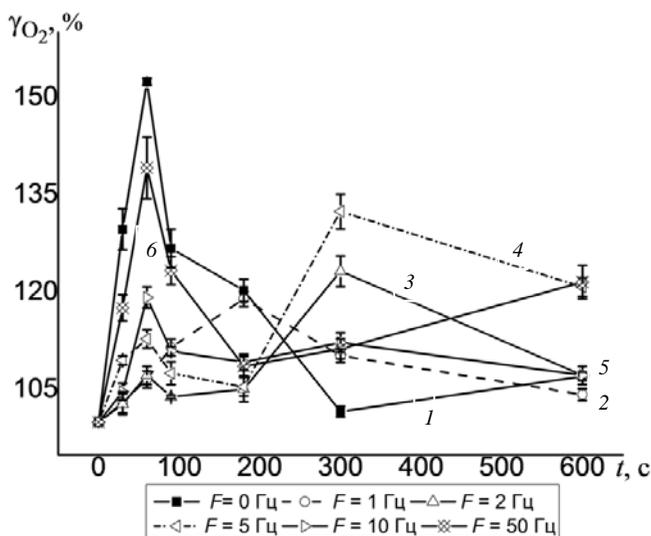


Рис. 106. Зависимость величины стимулирующего действия  $\gamma_{O_2}$  НИЛИ инфракрасной области спектра по критерию оксирезистентности 50-суточной молоди гибрида С.БС от времени экспозиции  $t$  и частоты модуляции  $F$

Контрольные (интактные) образцы икры выдерживают в тех же условиях, что и опытные. Количество икринок в опытной и контрольной группах составляет 300 шт.; количество повторностей – 3. Статистическую обработку полученных данных проводят по стандартной методике с использованием пакета Microsoft Excel. Достоверность полученных данных оценивают по критерию Стьюдента. Температура икры

в момент ее облучения лазером (а также в контрольных образцах) составляла  $(16 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .

Икру после лазерного облучения помещают в уменьшенные образцы аппаратов Вейса, предназначенные для инкубирования оплодотворенной икры, в которых по завершении эмбрионального развития происходит выклев предличинок. Опытные и контрольные группы содержат в отдельных аппаратах Вейса. В процессе инкубирования икры обеспечивается постоянство гидрохимических условий. Выклюнувшихся предличинок переносят в отдельные садки для каждой исследуемой группы. Плотность предличинок составляет 5000 шт/м<sup>2</sup>. Переход на активное питание происходит через  $(10 \pm 1)$  сут. При этом плотность посадки личинок сокращают в два раза и она составляет 2500 шт/м<sup>2</sup>. В первые 10 дней после перехода на активное питание кормление осуществляется науплиями артемии и стартовыми комбикормами в процентном соотношении 60:40, в последующем – только сухими комбикормами. Кормление должно происходить каждые 2 ч. В период выращивания температура воды составляет  $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ . Контроль за гидрохимическим режимом осуществляют ежедневно. По достижении молодью 50 сут, стандартного возраста для рыбопосадочного материала осетровых, выращенных в заводских условиях, проводят тесты на устойчивость к дефициту кислорода. Определение пороговых концентраций осуществляют в двухлитровых емкостях с притертыми пробками, в которые вмонтированы свежеекалиброванные электронные датчики содержания кислорода «Экотест-2000». Перед началом опыта определяют исходное содержание кислорода в воде, а затем в емкости помещают по 30 шт. стандартной молоди. При определении кислородного порога емкости помещают в аквариум с водой, чтобы избежать резких перепадов температуры. В момент наступления удушья каждой особи фиксируют концентрацию кислорода в воде. Критерием гибели молоди является остановка движения жаберных крышек.

Установлено, что воздействие на эмбрионы осетровых рыб на стадии органогенеза поляризованным лазерным излучением инфракрасной области спектра с длиной волны  $\lambda = (0,81 \pm 0,02)$  мкм при плотности мощности  $P = (2,9 \pm 0,2)$  мВт/см<sup>2</sup> способно оказывать стимулирующее действие на устойчивость стандартной заводской молоди осетровых рыб к дефициту кислорода. В табл. 5 приведены значения пороговых концентраций растворенного кислорода (в мг/л), вызывающих гибель стандартной молоди осетровых рыб, эмбрионы которой на стадии органогенеза не подвергались (контрольная группа) и подвергались

(опытная группа) воздействию поляризованного лазерного излучения инфракрасной области спектра.

Таблица 5. Значения пороговых концентраций растворенного в воде кислорода, вызывающих гибель стандартной молоди осетровых рыб, эмбрионы которой на стадии органогенеза подвергались воздействию поляризованного лазерного излучения инфракрасной области спектра различных параметров

Режим воздействия, частота модуляции $F$ , Гц	Время облучения, с	Пороговая концентрация кислорода, мг/л	Величина стимулирующего действия, %	Достоверность отличий от контроля
Контроль	0	$2,13 \pm 0,02$	–	–
Непрерывный, $F = 0$	30	$1,64 \pm 0,02$	$129,7 \pm 3,1$	$P < 0,001$
	60	$1,40 \pm 0,01$	$152,4 \pm 0,6$	$P < 0,001$
	90	$1,68 \pm 0,03$	$136,7 \pm 2,9$	$P < 0,001$
	180	$1,77 \pm 0,02$	$120,3 \pm 1,7$	$P < 0,001$
Модулированный, $F = 1$	180	$1,80 \pm 0,02$	$119,0 \pm 1,2$	$P < 0,001$
Модулированный, $F = 2$	300	$1,72 \pm 0,04$	$123,2 \pm 2,4$	$P < 0,001$
Модулированный, $F = 5$	300	$1,63 \pm 0,04$	$132,4 \pm 2,5$	$P < 0,001$
Модулированный, $F = 10$	60	$1,78 \pm 0,02$	$119,2 \pm 1,6$	$P < 0,001$

Из представленных данных следует, что облучение эмбрионов осетровых рыб на стадии органогенеза приводит к значительному снижению пороговых концентраций растворенного в воде кислорода, при которых наблюдается гибель стандартной молоди. Так, если в контрольной (необлученной) группе пороговая концентрация кислорода, при которой наблюдается гибель стандартной молоди осетровых рыб, составляет  $(2,13 \pm 0,02)$  мг/л, то для группы рыб, эмбрионы которой подвергались воздействию непрерывного лазерного излучения с длиной волны  $(0,81 \pm 0,02)$  мкм, плотностью мощности  $(2,9 \pm 0,2)$  мВт/см<sup>2</sup> в течение 60 с, –  $(1,40 \pm 0,01)$  мг/л (достоверность отличий от контроля  $P < 0,001$ ). То есть гибель молоди, эмбрионы которой подвергались воздействию оптического излучения, наблюдается при более низкой концентрации, чем у необлученных особей. Отметим, что при воздействии модулированного излучения с теми же параметрами ( $\lambda = (0,81 \pm 0,02)$  мкм,  $P = (2,9 \pm 0,2)$  мВт/см<sup>2</sup>) максимальное отличие от контроля наблюдается при  $F = 5$  Гц,  $t = 300$  с. В данном варианте воздействия  $[O_2]_0 = (1,78 \pm 0,02)$  мг/л (достоверность отличий от контроля  $P < 0,001$ ).

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что воздействие поляризованным лазерным излучением, как в непре-

рывном, так и в модулированном режимах, на эмбрионы осетровых рыб на стадии органогенеза обеспечивает повышение устойчивости стандартной молодежи осетровых рыб к дефициту кислорода.

Величина стимулирующего эффекта устойчивости к дефициту кислорода зависит от времени и режима воздействия лазерным излучением. На рис. 106 приведены зависимости величины стимулирующего эффекта  $\gamma$  от времени воздействия на эмбрионы осетровых рыб на стадии органогенеза непрерывного лазерного излучения (частота модуляции  $F = 0$  Гц), а также излучения, модулированного с частотой  $F = 1, 2, 5, 10$  Гц. Как видно из рис. 106 (кривая 1), максимальное повышение устойчивости к дефициту кислорода наблюдается при воздействии лазерным излучением в непрерывном режиме в течение 60 с и составляет  $(152,4 \pm 0,6) \%$  (достоверность отличий от контроля  $P < 0,001$ ). Увеличение или уменьшение времени воздействия в непрерывном режиме приводит к снижению стимулирующего эффекта. Так, при времени воздействия 30 с стимулирующий эффект составляет  $(129,7 \pm 3,1) \%$ , а при  $t = 90$  с  $\gamma = (136,7 \pm 2,9) \%$ . Согласно рис. 106 (кривая 1), дальнейшее увеличение времени облучения эмбрионов непрерывным излучением приводит к значительному сокращению эффекта стимуляции.

Таким образом, при облучении эмбрионов осетровых рыб на стадии органогенеза поляризованным лазерным излучением инфракрасной области спектра с длиной волны  $\lambda = (0,81 \pm 0,02)$  мкм при плотности мощности  $P = (2,9 \pm 0,2)$  мВт/см<sup>2</sup> максимальное стимулирующее действие устойчивости стандартной молодежи к дефициту кислорода наблюдается при времени воздействия 30–90 с.

Стимуляция устойчивости стандартной молодежи осетровых рыб к дефициту кислорода наблюдается также и при воздействии модулированным лазерным излучением. Однако, как видно из рис. 106, во всех вариантах модулированного воздействия ( $F = 1$  Гц (кривая 2),  $F = 2$  Гц (кривая 3),  $F = 5$  Гц (кривая 4),  $F = 10$  Гц (кривая 5)) стимулирующий эффект значительно ниже, чем при непрерывном режиме. Обращает на себя внимание тот факт, что оптимальное время воздействия для стимуляции устойчивости к дефициту кислорода зависит от частоты модуляции. Так, если для непрерывного излучения ( $F = 0$  Гц) максимальный эффект стимуляции наблюдается для  $t = 60$  с, то при частоте модуляции 1 Гц – для  $t = 180$  с, при  $F = 2$  и 5 Гц – для  $t = 300$  с, а при  $F = 10$  Гц – для  $t = 60$  с.

Таким образом, максимальное повышение устойчивости молодежи осетровых к дефициту кислорода при облучении оплодотворенной

икры на стадии органогенеза поляризованным лазерным излучением инфракрасной области спектра с длиной волны  $\lambda = (0,81 \pm 0,02)$  мкм наблюдается при немодулированном режиме воздействия при плотности мощности  $P = (2,9 \pm 0,2)$  мВт/см<sup>2</sup> в течение 30–90 с.

Отличительной особенностью заявленного способа повышения устойчивости стандартной молоди рыб к дефициту кислорода является его значительно более выраженный стимулирующий эффект в сравнении с прототипом, сокращение времени воздействия, а также возможность его применения как в технологии прудового, так и индустриального осетроводства. Действительно, если для прототипа максимальный стимулирующий эффект светового воздействия  $\gamma$  составляет 129 %, то при использовании заявленного способа  $\gamma = (152,4 \pm 0,6)$  %. При этом длительность воздействия для получения оптимального результата при использовании прототипа составляет не менее суток, тогда как при применении заявленного способа – 30–90 с. Следует также отметить, что поскольку воздействующее излучение является инфракрасным, то его применение в условиях искусственного воспроизводства и выращивания молоди осетровых рыб не создает (в отличие от прототипа) неудобств обслуживающему персоналу.

Результаты показали, что использование заявленного изобретения позволяет получить жизнестойкое потомство, обладающее более высокой устойчивостью к дефициту кислорода и характеризующееся более высокими размерно-весовыми показателями по сравнению с необлученными особями.

## **2.5. Способ повышения терморезистентности стандартной молоди осетровых рыб**

Задачей заявленного изобретения является получение жизнестойкого потомства, повышение эффективности искусственного воспроизводства и выращивания молоди осетровых, а также оптимизация технологии товарной аквакультуры.

Поставленная задача решается при применении способа повышения терморезистентности стандартной молоди осетровых рыб, основанного на воздействии внешнего фактора переменной природы, на эмбрионы рыб на стадии органогенеза воздействуют модулированным лазерным излучением ближней инфракрасной области спектра с плотностью мощности излучения  $P = (2,9 \pm 0,02)$  мВт/см<sup>2</sup> и частотой модуляции 50 Гц, время облучения 30–90 с.

Сущность предлагаемого способа заключается в следующем. Увлажненную оплодотворенную икру возвратного гибрида бестера (стерлядь × бестер ( $F_1$ )) на стадии органогенеза подвергают воздействию поляризованного лазерного излучения. Облучение осуществляют с помощью аппарата лазерного терапевтического «Сенс-815», созданного на базе полупроводникового лазера. Излучение лазера расфокусируют линзой с фокусным расстоянием  $f$ , равным 18 мм, таким образом, чтобы размер светового пятна соответствовал размеру монослоя облучаемой икры. Технические характеристики аппарата «Сенс-815» обеспечивают возможность воздействия лазерным излучением в непрерывном (частота модуляции  $F = 0$  Гц) и модулированном режимах при частоте модуляции 1, 2, 5, 10, 50 Гц. Плотность мощности (в мВт/см<sup>2</sup>) воздействующего на монослой лазерного излучения определяют по формуле  $P = W / S$ , где  $W$  – средняя мощность лазерного излучения, мВт;  $S$  – площадь светового пятна на уровне монослоя икры, см<sup>2</sup>.

При воздействии лазерным излучением в непрерывном режиме и режиме модуляции средняя мощность излучения  $W$  составляет  $(250 \pm 5)$  мВт. Выравнивание средней мощности излучения для указанных режимов воздействия осуществляют с панели управления аппаратом путем регулировки тока, протекающего через полупроводниковый лазер, и контролируют измерителем мощности и энергии лазерного излучения ИМО-3С.

Для определения оптимального времени воздействия, оказывающего максимальный стимулирующий эффект на терморезистентность стандартной молодежи осетровых рыб, облучение икры проводят в течение 30, 60, 90, 180, 300, 600 с. Полученные зависимости стимулирующего действия лазерного излучения ( $\gamma$ , %) от времени воздействия для различных режимов модуляции излучения представлены на рис. 107. На данном рисунке по оси абсцисс отложено время облучения в секундах, а по оси ординат – величина стимулирующего действия лазерного излучения, определяемая по формуле,  $\gamma = (Tr_o / Tr_k) 100$  %, где  $Tr_k$  – продолжительность выживания молодежи осетровых рыб при температуре 32 °С, эмбрионы которой не подвергались воздействию лазерного излучения, т. е. терморезистентность для контрольной группы, мин;  $Tr_o$  – продолжительность выживания молодежи осетровых рыб при температуре 32 °С, эмбрионы которой на стадии органогенеза подвергались воздействию поляризованным лазерным излучением инфракрасной области спектра, т. е. терморезистентность для опытной группы,

мин. Причем кривая 1 на рис. 107 соответствует варианту воздействия на эмбрионы на стадии органогенеза непрерывным (частота модуляции  $F = 0$  Гц) инфракрасным лазерным излучением с длиной волны  $\lambda = (0,81 \pm 0,02)$  мкм при плотности мощности  $P = (2,9 \pm 0,02)$  мВт/см<sup>2</sup>. Кривая 2 получена в результате облучения эмбрионов инфракрасным лазерным излучением с длиной волны  $\lambda = (0,81 \pm 0,02)$  мкм при плотности мощности  $P = (2,9 \pm 0,2)$  мВт/см<sup>2</sup>, модулированным по интенсивности с частотой  $F = 1$  Гц, кривая 3 – с частотой модуляции  $F = 2$  Гц, кривая 4 – с частотой модуляции  $F = 5$  Гц, кривая 5 – с частотой модуляции  $F = 10$  Гц, кривая 6 – с частотой модуляции  $F = 50$  Гц.

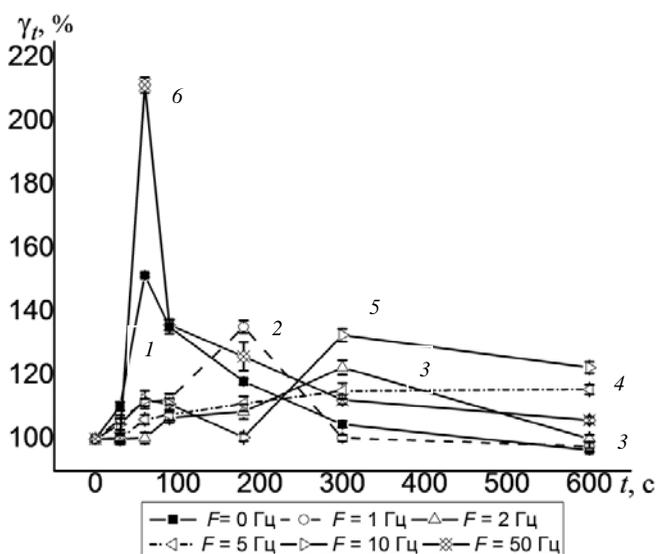


Рис. 107. Зависимость величины стимулирующего действия  $\gamma_t$  НИЛИ инфракрасной области спектра по критерию терморезистентности 50-суточной молоди гибрида С.БС от времени экспозиции  $t$  и частоты модуляции  $F$

Контрольные (интактные) образцы икры выдерживают в тех же условиях, что и опытные. Количество икринок в опытной и контрольной группах составляет 300 шт.; количество повторностей – 3. Статистическую обработку полученных данных проводят по стандартной методике с использованием пакета Microsoft Excel. Достоверность получен-

ных данных оценивают по критерию Стьюдента. Температура икры в момент ее облучения лазером (а также в контрольных образцах) составляла  $(6 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .

Икру после лазерного облучения помещают в уменьшенные образцы аппаратов Вейса, предназначенные для инкубирования оплодотворенной икры, в которых по завершении эмбрионального развития происходит выклев предличинок. Опытные и контрольные группы содержат в отдельных аппаратах Вейса. В процессе инкубирования икры обеспечивается постоянство гидрохимических условий. Выключившихся предличинок переносят в отдельные садки для каждой исследуемой группы. Плотность предличинок составляет  $5\,000 \text{ шт/м}^2$ . Переход на активное питание происходит через  $(10 \pm 1)$  сут. При этом плотность посадки личинок сокращают в два раза и она составляет  $2\,500 \text{ шт/м}^2$ . В первые 10 дней после перехода на активное питание кормление осуществляется науплиями артемии и стартовыми комбикормами в процентном соотношении 60:40, в последующем – только сухими комбикормами. Кормление должно происходить каждые 2 ч. В период выращивания температура воды составляет  $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ . Контроль за гидрохимическим режимом осуществляют ежедневно. По достижении молодью 50 сут, стандартного возраста для рыбопосадочного материала осетровых рыб, выращенных в заводских условиях, проводят тесты на терморезистентность. Опыты на определение терморезистентности проводили в 80-литровом аквариуме, в котором были смонтированы нагреватель мощностью в 2 кВт, фильтр-насос с микропроцессором для перемешивания и принудительной аэрации воды, реле для автоматического поддержания заданной температуры, контактный термометр и садочек из латунной сетки, в который помещались подопытные личинки. Опыты ставили по следующей схеме. Аквариум заполняли водой, в нем выдерживали молодь в течение 24 ч без пищи. Затем включали нагреватель и в течение 40–50 мин подогревали воду до  $31 ^\circ\text{C}$ . Через короткий промежуток времени температура поднималась до  $32 ^\circ\text{C}$ . Время терморезистентности отсчитывали с момента достижения температуры в  $32 ^\circ\text{C}$ . 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.

Установлено, что воздействие на эмбрионы осетровых рыб на стадии органогенеза поляризованным лазерным излучением инфракрасной области спектра с длиной волны  $\lambda = (0,81 \pm 0,02)$  мкм при плотно-

сти мощности  $P = (2,9 \pm 0,2)$  мВт/см<sup>2</sup> способно оказывать стимулирующее действие на терморезистентность стандартной заводской молодежи осетровых рыб. В табл. 6 приведены значения терморезистентности (в мин) или время выживания молодежи осетровых с момента достижения экстремальной температуры (32 °С), эмбрионы которой на стадии органогенеза не подвергались (контрольная группа) и подвергались (опытная группа) воздействию поляризованного лазерного излучения инфракрасной области спектра.

**Таблица 6. Значения терморезистентности или время выживания молодежи осетровых с момента достижения экстремальной температуры (32 °С), эмбрионы которой на стадии органогенеза подвергались воздействию поляризованного лазерного излучения инфракрасной области спектра различных параметров**

Режим воздействия, частота модуляции $F$ , Гц	Время облучения, с	Терморезистентность, мин	Величина стимулирующего действия, %	Достоверность отличий от контроля
Контроль	0	145,3 ± 1,1	100	–
Непрерывный, $F = 0$	60	220,0 ± 1,6	151,45 ± 0,6	$P < 0,001$
Модулированный $F = 1$	180	196,5 ± 2,9	135,3 ± 2,0	$P < 0,001$
Модулированный $F = 2$	300	178,2 ± 4,1	122,4 ± 2,3	$P < 0,001$
Модулированный $F = 5$	600	167,8 ± 2,3	115,5 ± 1,5	$P < 0,001$
Модулированный $F = 10$	300	132,6 ± 2,0	192,7 ± 4,0	$P < 0,001$
Модулированный $F = 50$	30	189,3 ± 1,5	130,28 ± 3,1	$P < 0,001$
	60	307,0 ± 3,5	211,3 ± 2,4	$P < 0,001$
	90	226,4 ± 2,6	155,8 ± 1,8	$P < 0,001$
	180	182,9 ± 6,5	125,9 ± 4,5	$P < 0,001$

Из представленных данных следует, что облучение эмбрионов осетровых рыб на стадии органогенеза приводит к значительному увеличению терморезистентности, которая проявляется в увеличении времени выживания молодежи при нахождении ее в воде экстремальной температуры (32 °С). Так, если в контрольной (необлученной) группе продолжительность терморезистентности  $Tr_k$  составила (145,3 ± 1,1) мин, то для группы рыб, эмбрионы которой подвергались воздействию модулированного лазерного облучения с частотой 50 Гц, длиной волны (0,81 ± 0,02) мкм, плотностью мощности (2,9 ± 0,2) мВт/см<sup>2</sup> в течение 60 с,  $Tr_o = (307,0 \pm 3,5)$  мин (достоверность отличий от контроля  $P < 0,001$ ). То есть гибель молодежи, эмбрионы которой подвергались воздействию оптического излучения, наблюдается при более продол-

жительном воздействии на нее экстремальной температуры, чем у необлученных особей. Отметим, что при воздействии немодулированного излучения с теми же параметрами ( $\lambda = (0,81 \pm 0,02)$  мкм,  $P = (2,9 \pm 0,2)$  мВт/см<sup>2</sup>) максимальное отличие от контроля наблюдается при  $t = 60$  с. В данном варианте воздействия  $T_{p_0} = (220,0 \pm 1,6)$  мин (достоверность отличий от контроля  $P < 0,001$ ).

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что воздействие поляризованным лазерным излучением, как в непрерывном, так и в модулированном режимах, на эмбрионы осетровых рыб на стадии органогенеза обеспечивает повышение терморезистентности стандартной молодежи осетровых рыб.

Величина стимулирующего эффекта терморезистентности зависит от времени и режима воздействия лазерным излучением. На рис. 107 приведены зависимости величины стимулирующего эффекта  $\gamma$  от времени воздействия на эмбрионы осетровых рыб на стадии органогенеза непрерывного лазерного излучения (частота модуляции  $F = 0$  Гц), а также излучения, модулированного с частотой  $F = 1, 2, 5, 10, 50$  Гц. Как видно из рис. 107 (кривая б), максимальное повышение терморезистентности наблюдается при воздействии лазерным излучением в модулированном режиме  $F = 50$  Гц в течение 60 с и составляет  $(211,3 \pm 2,4)$  % (достоверность отличий от контроля  $P < 0,001$ ). Увеличение или уменьшение времени воздействия в модулированном режиме  $F = 50$  Гц приводит к снижению стимулирующего эффекта. Так, при времени воздействия 30 с стимулирующий эффект составляет  $(130,28 \pm 3,1)$  %, а при  $t = 90$  с  $\gamma = (155,8 \pm 1,83)$  %. Согласно рис. 107 (кривая 1), дальнейшее увеличение времени облучения эмбрионов в модулированном режиме  $F = 50$  Гц приводит к значительному сокращению эффекта стимуляции.

Таким образом, при облучении эмбрионов осетровых рыб на стадии органогенеза поляризованным лазерным излучением инфракрасной области спектра с длиной волны  $\lambda = (0,81 \pm 0,02)$  мкм при плотности мощности  $P = (2,9 \pm 0,2)$  мВт/см<sup>2</sup> максимальное стимулирующее действие термоустойчивости молодежи осетровых рыб наблюдается при времени воздействия 30–90 с.

Стимуляция терморезистентности стандартной молодежи осетровых рыб наблюдается также и при воздействии непрерывным и другими модулированными режимами лазерного излучения. Однако, как видно из рис. 107, во всех остальных вариантах модулированного воздействия ( $F = 1$  Гц (кривая 2),  $F = 2$  Гц (кривая 3),  $F = 5$  Гц (кривая 4),  $F = 10$  Гц

(кривая 5)), а также непрерывного воздействия (кривая 1) стимулирующий эффект значительно ниже, чем при частоте модуляции  $F = 50$  Гц. Обращает на себя внимание тот факт, что оптимальное время воздействия для стимуляции терморезистентности зависит от частоты модуляции. Так, если для непрерывного излучения ( $F = 0$  Гц) максимальный эффект стимуляции наблюдается для  $t = 60$  с, то при частоте модуляции  $F = 1$  Гц – для  $t = 180$  с, при  $F = 2$  Гц – для  $t = 300$  с, при  $F = 5$  Гц – для  $t = 600$  с, а при  $F = 10$  Гц – для  $t = 300$  с.

Таким образом, максимальное повышение терморезистентности при облучении оплодотворенной икры на стадии органогенеза поляризованным лазерным излучением инфракрасной области спектра с длиной волны  $\lambda = (0,81 \pm 0,02)$  мкм наблюдается для модулированного режима ( $F = 50$  Гц) воздействия с плотностью мощности  $P = (2,9 \pm 0,2)$  мВт/см<sup>2</sup> в течение 30–90 с.

Отличительной особенностью заявленного способа повышения терморезистентности стандартной молоди осетровых рыб является его значительно более выраженный стимулирующий эффект в сравнении с прототипом, сокращение времени воздействия (30–90 с), а также возможность его применения как в технологии прудового, так и индустриального осетроводства.

## **2.6. Способ повышения репродуктивных качеств производителей осетровых рыб**

Задачей заявленного изобретения является повышение эффективности искусственного воспроизводства осетровых рыб за счет повышения репродуктивных качеств производителей, что выражается в увеличении процента созревания особей (ответа на гормональные инъекции), а также в улучшении качества половых продуктов самок и самцов.

Поставленная задача решается следующим образом. При применении способа повышения репродуктивных качеств осетровых рыб, заключающегося в том, что в преднерестовый период в течение пяти дней на 4–5 точек жаберных лепестков производителей оказывают воздействие лазером с длиной волны  $\lambda = (670 \pm 20)$  нм при плотности мощности излучения 40–50 мВт/см<sup>2</sup> с общей экспозицией 8–10 мин ежедневно, затем через 4–7 дней доводят температуру воды до 14–16 °С и осуществляют преднерестовое выдерживание и гормональную стимуляцию производителей.

Сущность предлагаемого способа заключается в следующем: производители осетровых рыб (бестер аксайской породы) в период начала подъема температуры воды для нерестового режима за 1–2 нед до предполагаемого нереста подвергаются воздействию поляризованного излучения полупроводникового лазера красной области спектра. Воздействие осуществляют с помощью терапевтического лазерного аппарата «Айболит КН-15». Длина волны излучения лазера  $\lambda = (670 \pm 20)$  нм, мощность излучения на выходе аппарата  $W = 8\text{--}10$  мВт, площадь светового пятна на поверхности жаберных лепестков  $S = 0,2$  см<sup>2</sup>, плотность мощности излучения, воздействующего на жаберные лепестки рыб,  $P = W/S = 40\text{--}50$  мВт/см<sup>2</sup>. Экспозиция на каждую точку 1 мин. Воздействие осуществляют на 4–5 точек с каждой стороны, т. е. под каждую жаберную крышку. Общая продолжительность лазерной процедуры 8–10 мин в день; количество сеансов – 5, осуществляют их ежедневно. Через 4–7 дней после процедуры облучения производителей выводят на нерестовую температуру (14–16 °С) и проводят ряд процедур, принятых в современной практике аквакультуры осетровых, направленных на получение личинок от производителей: преднерестовое выдерживание, гормональную стимуляцию, получение половых продуктов (спермы и икры), обесклеивание и инкубацию икры. Продолжительность выдерживания производителей на нерестовых температурах перед инъектированием гормональными препаратами зависит от зрелости ооцитов (коэффициента поляризации). Гормональное инъектирование осуществляют с помощью ацетонированного гипофиза осетровых рыб. Сперму получают с помощью катетера и пластикового шприца Жане, овулированную икру – прижизненно по методу С. Б. Подушки (метод надрезания яйцеводов). Оплодотворение полусухое. В качестве обесклеивающего вещества применяют танин. Инкубацию икры осуществляют в аппаратах Вейса.

Проведенные нами исследования показали, что воздействие на производителей осетровых рыб лазерным излучением в преднерестовый период приводит к повышению репродуктивных качеств, а также к повышению эффективности воспроизводства осетровых в целом.

Изучение содержания половых гормонов в крови рыб позволяет получить важную информацию о физиологическом состоянии производителей: готовности к нересту и ожидаемом ответе на гормональное стимулирование. На рис. 108 отражена динамика изменения концентрации половых гормонов самок в период начала подъема температуры воды для нерестового режима, до воздействия лазерным излучением.

ем (пробы *A*), а также после воздействия лазерным излучением и после нереста (пробы *B*). Взятие крови непосредственно после курса воздействия лазерным излучением, но перед нерестом не осуществлялось по причине возможной негативной реакции самок на пункцию хвостовой вены в виде ухудшения качества половых продуктов.

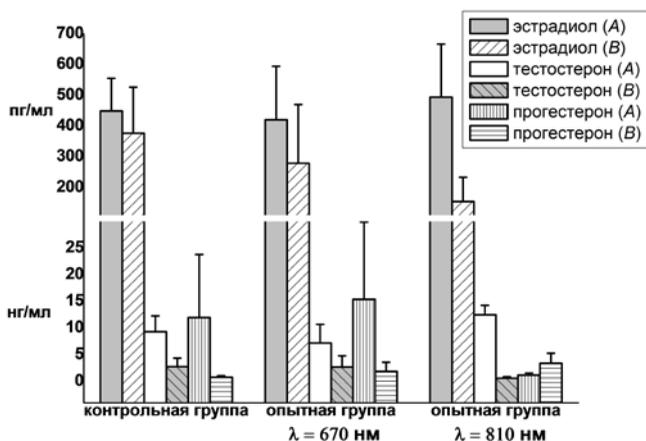


Рис. 108. Изменение концентрации половых гормонов самок возвратного гибрида бестера в преднерестовый (пробы *A*) и посленерестовый (пробы *B*) периоды в зависимости от воздействия лазерным излучением различных спектральных диапазонов ( $\lambda = 670$  и  $810$  нм)

Как видно из рис. 108, у самок всех исследуемых групп происходит снижение концентрации половых гормонов после нереста. Однако при анализе данных можно заключить, что в группах, в которых самки в преднерестовый период подвергались воздействию лазерного излучения, снижение концентрации гормонов после нереста происходило интенсивнее, что может свидетельствовать о более эффективной реакции организма на гормональное стимулирование. Особенно сильное снижение концентрации гормонов наблюдалось на примере эстрадиола. Так, если в контрольной группе снижение концентрации эстрадиола после нереста относительно донерестового значения происходило на 16,0 %, то в опытных группах – на 33,6 % (воздействие лазерным излучением красной области спектра ( $\lambda = 670$  нм)) и на 68,8 % (воздействие лазерным излучением инфракрасной области спектра ( $\lambda = 810$  нм)).

В табл. 7 представлены значения влияния лазерного излучения на рыбоводно-биологические показатели нереста самок.

Таблица 7. Влияние лазерного излучения на рыбоводно-биологические показатели нереста самок возвратного гибрида бестера

Параметр	Группа		
	контрольная	1-я опытная ( $\lambda = 670$ нм, красная область спектра, $P = 45$ мВт/см <sup>2</sup> )	2-я опытная ( $\lambda = 810$ нм, инфракрасная область спектра, $P = 125$ мВт/см <sup>2</sup> )
Ответ на гормональное стимулирование, %	50,0	80,0	80,0
Оплодотворение, %	91,8	97,3	96,6
Выживаемость при выклеве, %	71,0	84,1	75,9
Выживаемость при переходе на активное питание, %	68,7	83,2	80,4

Как видно из табл. 7, воздействие лазерным излучением на самок в преднерестовый период способно повысить качество искусственного воспроизводства: у самок опытных групп наблюдалось повышение количества особей, положительно реагирующих на гормональное стимулирование, а также более высокое качество половых продуктов в виде увеличения процента оплодотворения и выживаемости в начальные периоды постэмбрионального развития (стадии выклева и перехода на активное питание). При этом лучшие показатели наблюдаются при воздействии лазерным излучением красной области спектра ( $\lambda = 670$  нм). Следует отметить, что оплодотворение икры, как самок контрольной, так и опытных групп, осуществлялось смесью спермы самцов бестера  $F_1$ , которые не подвергались облучению.

На рис. 109 представлена динамика изменения концентрации половых гормонов самцов в период начала подъема температуры воды для нерестового режима до воздействия лазерным излучением (пробы А), после воздействия лазерным излучением, до нереста (пробы В), а также после нереста (пробы С).

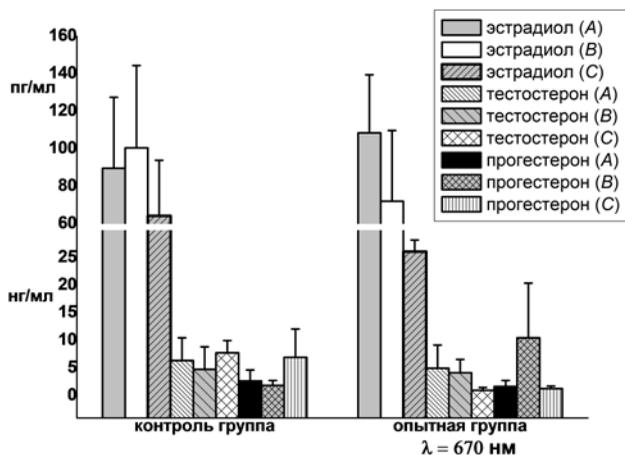


Рис. 109. Изменение концентрации половых гормонов самцов возвратного гибрида бестера в преднерестовый (пробы А, В) и посленерестовый (пробы С) периоды в зависимости от воздействия лазерным излучением ( $\lambda = 670$  нм)

Как видно из рис. 109, у самцов наблюдаются различные колебания концентрации половых гормонов. Так, если в контрольной и опытной группах происходило снижение концентрации эстрадиола после нереста (пробы С), то концентрации тестостерона и прогестерона после нереста увеличивались в контрольной группе или незначительно снижались в опытной. При этом у самцов, на которых воздействовали лазерным излучением красной области спектра ( $\lambda = 670$  нм), концентрация эстрадиола после нереста снижалась на 75,9 % (в контрольной группе – на 28,2 %). Такое различие в изменении концентрации половых гормонов, вероятно, связано с различной реакцией самцов контрольной и опытной групп на гормональное стимулирование (табл. 8).

Таблица 8. Влияние лазерного излучения на репродуктивно-биологические показатели нереста самцов возвратного гибрида бестера

Параметры	Контрольная группа	Опытная группа ( $\lambda = 670$ нм, красная область спектра, $P = 45$ мВт/см <sup>2</sup> )
Ответ на гормональное стимулирование, %	50	100
Объем эякулята, см <sup>3</sup>	6	10,5
Время подвижности сперматозоидов при активации водой, с	130	180
Качество спермы (по шкале Персова), баллы	4,5	4,75

Как видно из табл. 8, у самцов, которые подвергались воздействию лазерным излучением красной области спектра ( $\lambda = 670$  нм), наблюдалось увеличение количества особей, положительно реагирующих на гормональное стимулирование, а также более высокое качество половых продуктов в виде увеличения объема эякулята, времени подвижности сперматозоидов и качества спермы.

Представленные данные свидетельствуют о способности низкоинтенсивного лазерного излучения оказывать влияние на производителей осетровых рыб, повышая эффективность технологии воспроизводства, что выражается в повышении количества особей, положительно реагирующих на гормонально инъекционное, увеличении качества половых продуктов и выживаемости потомства. Наиболее оптимальным является воздействие лазерным излучением красной области спектра ( $\lambda = 670$  нм).

### **2.7. Способ повышения активности сперматозоидов самцов осетровых рыб**

Сущность предлагаемого способа заключается в том, что сперма осетровых рыб подвергается воздействию лазерного излучения в присутствии постоянного магнитного поля. Воздействие осуществляют поляризованным лазерным излучением красной области спектра с длиной волны  $\lambda = (670 \pm 20)$  нм, плотностью мощности  $P = (3,0 \pm 0,2)$  мВт/см<sup>2</sup> в сочетании с магнитным полем с индукцией  $(50 \pm 5)$  мТл. Излучатель аппарата с магнитной насадкой располагают таким образом, чтобы сперма рыб находилась под проекцией магнитной насадки, а размер светового пятна соответствовал размеру слоя облучаемой спермы. При этом излучение лазера проходит через отверстие, расположенное в центре магнитной насадки. Мощность излучения  $W$  на выходе излучателя контролируют с помощью измерителя мощности ИМО-3С. Плотность мощности (в мВт/см<sup>2</sup>) излучения, воздействующего на слой спермы, определяют по формуле  $P = W / S$ , где  $W$  – средняя мощность излучения, мВт;  $S$  – площадь светового пятна на уровне слоя спермы, см<sup>2</sup>.

Затем проводят аналогичный эксперимент при выключенном лазерном излучении, когда на сперму воздействует только магнитное поле.

Следующую серию экспериментальных исследований проводят для изучения воздействия на сперму лазерного излучения в отсутствие магнитного поля. С этой целью из лазерного излучателя извлекается

магнитная насадка и вставляется расфокусирующая насадка, обеспечивающая аналогичную расходимость лазерного излучения, как и в случае использования магнитной насадки.

Отбор спермы осуществляют от самцов бестера  $F_1$  с помощью катетера и пластикового шприца Жане. Для стимулирования созревания применяют препарат Нерестин 5-А в количестве 0,1 мл/кг. Средняя масса самцов составляет 6,3 кг, средняя длина – 92,7 см. Средний объем эякулята 110 см<sup>3</sup>. Температура воды в период взятия половых продуктов 14,5 °С. Вся отобранная сперма оценивается в 5 баллов по 5-балльной шкале Персова.

Для определения оптимального времени воздействия, оказывающего максимальный стимулирующий эффект на подвижность сперматозоидов осетровых рыб, воздействие физических факторов на сперму осуществляют в течение 10, 20, 30, 40, 50, 60 с. После этого сперма помещается на хранение в прохладное затемненное место. Температура хранения не более 4–5 °С.

По истечении 24 ч проводится определение времени активности сперматозоидов (время поступательного движения сперматозоидов после активации водой). Для определения активности сперматозоидов пробу спермы (10 мкл) наносят на предметное стекло и при увеличении в 200 раз вначале исследуют без разбавления водой, определяя отсутствие (присутствие) примесей в пробах (форменные элементы крови, микроорганизмы и пр.). Затем вносят каплю воды на предметное стекло, перемешивают со спермой и на секундомере засекают время начала активации сперматозоидов. При прекращении поступательного движения 90 % сперматозоидов секундомер останавливают. В каждой пробе время поступательного движения определяется не менее трех раз.

По результатам полученных данных определяют величину стимулирующего действия физических факторов на время активности сперматозоидов по следующей формуле:  $\gamma = (t_o / t_k) 100 \%$ , где  $t_o$  – время поступательного движения сперматозоидов после активации водой через 24 ч хранения после воздействия физических факторов (опытная группа), с;  $t_k$  – время поступательного движения сперматозоидов после активации водой через 24 ч хранения без воздействия оптического излучения (контрольная группа), с.

Контрольные образцы икры выдерживают в тех же условиях, что и опытные. Статистическую обработку полученных результатов проводят с помощью статистических приложений Origin 7.5.

Установлено, что воздействие на сперму самцов осетровых рыб лазерным излучением красной области спектра в сочетании с магнитным полем приводит к повышению активности сперматозоидов, что выражается в увеличении времени поступательного движения сперматозоидов после активации водой.

Вышесказанное подтверждается данными, представленными в табл. 9.

Таблица 9. Влияние лазерного излучения красной области спектра постоянного магнитного поля, а также совместного действия лазерного излучения и постоянного магнитного поля на время активности сперматозоидов самцов осетровых рыб после активации водой через 24 ч после хранения

Группы	Время воздействия, с	Время подвижности сперматозоидов, с	Величина стимулирующего действия $\gamma$ , %	Уровень значимости
Контроль	0	120,0 ± 7,6	100	–
Магнитное поле (50 ± 5) мТл)	10	124,2 ± 7,4	103,5 ± 1,6	–
	20	122,3 ± 9,5	101,9 ± 6,7	–
	30	125,3 ± 5,0	104,4 ± 1,1	–
	40	123,8 ± 3,7	103,2 ± 4,5	–
	50	125,0 ± 9,0	104,2 ± 2,3	–
	60	126,8 ± 8,8	105,7 ± 4,2	P < 0,05
Лазерное излучение ( $\lambda = 670$ нм, красная область спектра, $P = (3,0 \pm 0,2)$ мВт/см <sup>2</sup> )	10	168,2 ± 7,8	140,2 ± 3,4	P < 0,05
	20	183,7 ± 7,5	153,1 ± 2,7	P < 0,05
	30	210,6 ± 9,1	175,5 ± 4,2	P < 0,01
	40	260,0 ± 7,6	216,7 ± 6,4	P < 0,05
	50	252,0 ± 8,9	210,0 ± 5,6	P < 0,05
	60	241,6 ± 8,6	201,3 ± 3,2	–
Лазерное излучение ( $\lambda = 670$ нм, красная область спектра, $P = (3,0 \pm 0,2)$ мВт/см <sup>2</sup> ) + магнитное поле (50 ± 5) мТл)	10	199,6 ± 9,4	166,3 ± 5,6	P < 0,05
	20	294,0 ± 10,2	245,0 ± 6,8	P < 0,05
	30	252,5 ± 11,2	210,4 ± 5,4	P < 0,05
	40	226,4 ± 7,8	188,7 ± 7,0	P < 0,05
	50	204,0 ± 8,9	170,0 ± 5,9	–
	60	171,8 ± 7,6	143,2 ± 6,9	–

Из представленных данных следует, что воздействие постоянного магнитного поля с индукцией (50 ± 5) мТл на сперму самцов осетровых рыб приводит к повышению качества половых продуктов, что проявляется в увеличении времени подвижности сперматозоидов после активации водой. Однако стимулирующее действие постоянного магнитного поля, является слабовыраженным. Максимальный эффект наблюдается при времени воздействия, равном 60 с, и составляет (105,7 ± 4,2) %. В этом случае максимальное время подвижности спер-

матозоидов  $t_o$  составляет  $(126,8 \pm 8,8)$  с, тогда как для контрольных образцов  $t_k = (120,0 \pm 7,6)$  с.

Более выраженное активирующее действие на сперму осетровых рыб оказывает лазерное излучение красной области спектра ( $\lambda = 670$  нм,  $P = (3,0 \pm 0,2)$  мВт/см<sup>2</sup>). При оптимальных условиях воздействия лазерным излучением в отсутствие магнитного поля время подвижности сперматозоидов  $t_o$  составляет  $(260,0 \pm 7,6)$  секунд ( $\gamma = (216,7 \pm 6,4)$  %) и наблюдается при экспозиции 40 с. Уменьшение или увеличение времени экспозиции приводит к снижению стимулирующего действия.

Однако наиболее выраженное активирующее действие на сперму осетровых рыб оказывает совместное действие лазерного излучения ( $\lambda = (670 \pm 20)$  нм,  $P = (3,0 \pm 0,2)$  мВт/см<sup>2</sup>) и постоянного магнитного поля  $((50 \pm 5)$  мТл). При совместном действии указанных физических факторов максимальный эффект стимуляции наблюдается при времени воздействия 20 с и составляет  $(245 \pm 6,8)$  % ( $t_o = (294,0 \pm 10,2)$  с). Достаточно выраженным также является воздействие лазерного излучения и постоянного магнитного поля в течение 30 с:  $\gamma = (245 \pm 6,8)$  % ( $t_o = (210,4 \pm 5,4)$  с).

Заявленный способ не является простой суммой двух известных способов, основанных на воздействии физических факторов. При воздействии только магнитного поля максимальное стимулирующее действие наблюдается при экспозиции 60 с, а при воздействии только лазерным излучением – при экспозиции 40 с. При одновременном действии двух физических факторов максимальный стимулирующий эффект на сперму осетровых рыб наблюдается при экспозиции 20–30 с. Таким образом, при одновременном действии двух физических факторов оптимальное время воздействия ниже, чем каждого из них в отдельности. Синергизм действия двух физических факторов проявляется в том, что эффект стимуляции при одновременном действии лазерного излучения и магнитного поля ( $\gamma = (245 \pm 6,8)$  %) в течение 20 с значительно превышает сумму эффектов ( $\gamma = 101,9 + 153,1 = 155,0$  %) каждого из воздействующих факторов в отдельности:  $\gamma = (101,9 \pm 6,7)$  % – для магнитного поля и  $\gamma = (153,1 \pm 2,7)$  % – для лазерного излучения. Все это свидетельствует о том, что заявленный способ обработки спермы рыб не является простой суммой двух известных способов.

Характерно, что сперма, подвергнутая совместному действию лазерного излучения и магнитного поля, обладает более высокой способностью к оплодотворению икры. Так, если в случае использования интактной (контрольный вариант) спермы процент оплодотворения

икры осетровых рыб составляет 75 %, то при использовании спермы, обработанной заявленным способом, процент оплодотворения икры достигает 87 %.

Таким образом, заявленный способ позволяет увеличить время подвижности сперматозоидов после активации водой и повысить вероятность успешного оплодотворения икры.

Заявленный способ может использоваться в практике осетроводства с целью сохранения качества спермы самцов при длительном хранении без консервации в условиях, когда сбор спермы самцов уже осуществлен, а овуляция икры самок растягивается на продолжительное время.

## 2.8. Способ обработки спермы рыб

Задачей заявленного изобретения является повышение стимулирующего действия света на сперму рыб.

Поставленная задача решается следующим образом. При применении данного способа обработки спермы осетровых рыб воздействие осуществляют модулированным по интенсивности излучением с длиной волны  $\lambda = 450\text{--}1270$  нм, частотой модуляции  $F = 50\text{--}60$  Гц, плотностью мощности  $P = 0,5\text{--}100$  мВт/см<sup>2</sup> в течение времени, обеспечивающего энергетическую дозу в 60–180 мДж/см<sup>2</sup>.

Сущность предлагаемого способа заключается в том, что сперма осетровых рыб подвергается воздействию оптического излучения. Воздействие осуществляют модулированным по интенсивности поляризованным излучением лазерных или светодиодных источников в спектральном диапазоне от 450 до 1270 нм с плотностью мощности  $P = 0,5\text{--}100$  мВт/см<sup>2</sup> и частотой модуляции  $F = 50\text{--}60$  Гц.

Излучатель аппарата располагают таким образом, чтобы размер светового пятна соответствовал размеру слоя облучаемой спермы. Мощность излучения  $W$  на выходе излучателя контролируют с помощью измерителя мощности ИМО-3С. Плотность мощности (в мВт/см<sup>2</sup>) излучения, воздействующего на слой спермы, определяют по формуле  $P = W/S$ , где  $W$  – средняя мощность излучения, мВт;  $S$  – площадь светового пятна на уровне слоя спермы, см<sup>2</sup>. Энергетическую дозу (в мДж/см<sup>2</sup>) определяют по формуле  $E = P \cdot t$ , где  $t$  – время облучения, с.

В результате наших исследований установлено, что воздействие на сперму самцов осетровых рыб модулированным оптическим излучением приводит к повышению активности сперматозоидов, что выража-

ется в увеличении их подвижности после облучения. Вышесказанное подтверждается данными, представленными в табл. 10–12.

Таблица 10. Влияние поляризованного оптического излучения с длиной волны 450 нм в различных энергетических дозах и режимах воздействия на параметры подвижности сперматозоидов самцов осетровых рыб (указаны максимальные величины стимулирующего действия для каждой плотности мощности)

Группы	Время облучения $t$ , с	Плотность мощности $P$ , мВт/см <sup>2</sup>	Энергетическая доза $E$ , мДж/см <sup>2</sup>	Величина стимулирующего действия $\gamma$ , %	Статистический уровень значимости $P$
Контроль	0,0	0	0	100	–
Непрерывное излучение	180,0	0,5	90	119,0 ± 2,2	$P < 0,05$
	30,0	3,0	90	132,2 ± 7,6	$P < 0,05$
	0,9	100,0	90	115,0 ± 1,2	$P < 0,05$
Излучение, модулированное с частотой $F = 5$ Гц	240,0	0,5	120	107,0 ± 4,8	$P < 0,05$
	40,0	3,0	120	118,9 ± 11,2	–
	1,2	100,0	120	103,5 ± 7,5	$P < 0,05$
Излучение, модулированное с частотой $F = 50$ Гц	180,0	0,5	90	121,7 ± 1,2	$P < 0,05$
	30,0	3,0	90	135,3 ± 1,3	$P < 0,05$
	0,9	100,0	90	117,7 ± 4,5	–
Излучение, модулированное с частотой $F = 60$ Гц	180,0	0,5	90	119,8 ± 5,0	$P < 0,05$
	30,0	3,0	90	133,1 ± 3,8	$P < 0,05$
	0,9	100,0	90	115,8 ± 1,2	$P < 0,05$
Излучение, модулированное с частотой $F = 100$ Гц	180,0	0,5	90	114,7 ± 4,2	$P < 0,05$
	30,0	3,0	90	127,4 ± 14,3	$P < 0,05$
	0,9	100,0	90	110,9 ± 1,9	–

Из представленных данных следует, что воздействие непрерывного лазерного излучения в спектральном диапазоне от 450 до 1270 нм приводит к повышению качества половых продуктов, что проявляется в увеличении подвижности их после активации. Увеличение длины волны воздействующего излучения свыше 1270 нм является нецелесообразным в связи с тем, что в области примерно 1300 нм наблюдается поглощение излучения водой, что может привести к термическому повреждению сперматозоидов. Использование излучения с длиной волны короче

450 нм также является нецелесообразным, так как в этом случае стимулирующее действие слабо выражено и нередко наблюдается ингибирование активности клеток спермы.

Выполненные исследования (табл. 10–12) показали, что фотобиологическое действие на сперматозоиды зависит как от длины волны воздействующего излучения, так и от его плотности мощности, энергетической дозы и частоты модуляции.

Таблица 11. Влияние поляризованного оптического излучения с длиной волны 670 нм в различных энергетических дозах и режимах воздействия на время активности сперматозоидов самцов осетровых рыб (указаны максимальные величины стимулирующего действия)

Группы	Время облучения $t$ , с	Плотность мощности $P$ , мВт/см <sup>2</sup>	Энергетическая доза $E$ , мДж/см <sup>2</sup>	Величина стимулирующего действия $\gamma$ , %	Статистический уровень значимости $P$
Непрерывное излучение	40	3,0	120	216,7 ± 6,4	$P < 0,05$
Излучение, модулированное с частотой $F = 5$ Гц	40	3,0	120	137,8 ± 9,6	$P < 0,05$
Излучение, модулированное с частотой $F = 50$ Гц	40	3,0	120	225,5 ± 4,3	$P < 0,05$
Излучение, модулированное с частотой $F = 60$ Гц	240	0,5	120	264,8 ± 2,4	$P < 0,05$
Излучение, модулированное с частотой $F = 100$ Гц	40	3,0	120	204,8 ± 10,1	$P < 0,05$

Максимальное стимулирующее действие света на сперму рыб регистрировалось при плотности мощности  $P = 0,5–100$  мВт/см<sup>2</sup> и энергетической дозе 60–180 мДж/см<sup>2</sup>. Снижение плотности мощности ниже 0,5 мВт/см<sup>2</sup> является нецелесообразным, так как в этом случае наблюда-

ется снижение стимулирующего эффекта, а кроме того, для набора энергетической дозы в 60–180 мДж/см<sup>2</sup> длительность воздействия может превышать 600 с (10 мин), что снижает производительность процесса и увеличивает вероятность нарушения режима стерильности. Повышение плотности мощности свыше 100 мВт/см<sup>2</sup> также является нецелесообразным, так как в этом случае можно вызвать термическое повреждение сперматозоидов, что приведет к эффекту ингибирования их активности. Установлено, что применение режима модуляции излучения в зависимости от ее частоты способно как повысить стимулирующий эффект, характерный для непрерывного излучения, так и снизить его.

**Таблица 12. Влияние поляризованного оптического излучения с длиной волны 1270 нм в различных энергетических дозах и режимах воздействия на время активности сперматозоидов самцов осетровых рыб (указаны максимальные величины стимулирующего действия)**

Группы	Время облучения $t$ , с	Плотность мощности $P$ , мВт/см <sup>2</sup>	Энергетическая доза $E$ , мДж/см <sup>2</sup>	Величина стимулирующего действия $\gamma$ , %	Статистический уровень значимости $P$
Непрерывное излучение	30	3,0	90	199,5 ± 13,2	$P < 0,05$
Излучение, модулированное с частотой $F = 5$ Гц	30	3,0	90	140,5 ± 13,2	$P < 0,05$
Излучение, модулированное с частотой $F = 50$ Гц	30	3,0	90	210,5 ± 11,2	$P < 0,05$
Излучение, модулированное с частотой $F = 60$ Гц	0,9	100,0	90	269,1 ± 1,6	$P < 0,05$
Излучение, модулированное с частотой $F = 100$ Гц	30	3,0	90	200,7 ± 14,9	$P < 0,05$

Как следует из табл. 10–12, при воздействии излучения, модулированного с низкой частотой ( $F = 5$  Гц), стимулирующий эффект ниже, чем при непрерывном воздействии. При увеличении частоты модуляции происходит увеличение величины стимулирующего эффекта, который достигает своего максимума при  $F = 50–60$  Гц. При дальнейшем увеличении частоты модуляции до  $F = 100$  Гц эффект стимуляции светового воздействия мало отличается от такового при использовании непрерывного (немодулированного) излучения. Поэтому повышение или снижение частоты модуляции света за пределы  $F = 50–60$  Гц является нецелесообразным.

Установлено, что сперма, подвергнутая действию лазерного излучения при оптимальных параметрах (длина волны излучения в спектральном диапазоне от 450 до 1270 нм, плотность мощности  $P = 0,5–100$  мВт/см<sup>2</sup>, энергетическая доза  $E = 60–180$  мДж/см<sup>2</sup>), обладала более высокой способностью к оплодотворению икры. Увеличение (по сравнению с контролем) времени подвижности сперматозоидов в результате воздействия оптического излучения характеризует улучшение качества спермы, поскольку это приводит к более высокой вероятности успешного оплодотворения икры. И наоборот, снижение (по сравнению с контролем) времени подвижности сперматозоидов в результате воздействия оптического излучения отражает снижение качества спермы. Так, если в случае использования интактной (контрольный вариант) спермы процент оплодотворения икры осетровых рыб составлял 72 %, то при использовании спермы, обработанной заявленным способом, процент оплодотворения икры достигал 90 %.

Описываемый способ позволяет увеличить время подвижности сперматозоидов после активации водой и повысить вероятность успешного оплодотворения икры. Данный способ может использоваться в практике осетроводства с целью сохранения качества спермы самцов при длительном хранении без консервации в условиях, когда сбор спермы самцов уже осуществлен, а овуляция икры самок растягивается на продолжительное время.

## 2.9. Установка для инкубации икры

Технической задачей заявленной полезной модели является повышение эффективности инкубации, выживаемости эмбрионов рыб в процессе инкубации, выхода личинок из оплодотворенной икры и качества получаемого рыбопосадочного материала.

Поставленная задача решается с помощью установки для инкубации икры, включающей герметичную емкость с патрубком для подачи воды, сливным носиком для сброса воды и горизонтально расположенную ниже поверхности воды рамку для икры, обтянутую сеткой с размерами ячеек меньше размеров икры и больше размеров предличинок. Емкость имеет крышку, выполненную из стекла органического цветного красного, покрытого поляридной пленкой, ее можно поворачивать на угол  $0-180^\circ$  вокруг оси, зафиксированной на стенке емкости, противоположной сливному носику. Установка также содержит микропроцессор для оценки оптимальной дозы поляризованного излучения, воздействующего на икру, электрически связанный с установленными под крышкой датчиком положения крышки и фотоприемником, приемное окно которого направлено в сторону крышки. Причем фотоприемник срабатывает посредством датчика положения крышки при ее закрытом положении.

Предлагаемое устройство для инкубации икры изображено на рис. 110.

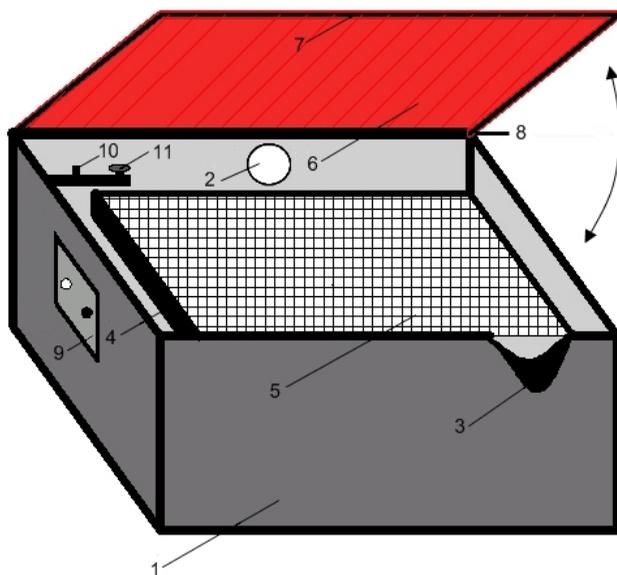


Рис. 110. Установка для инкубации икры

Герметичная емкость 1 размером 500 (длина)×200 (ширина)×100 (высота) мм заполняется водой по патрубку 2. Сброс воды из емкости осуществляется через сливной носик 3, расположенный с противоположного от патрубка 2 края емкости. Рамка 4 для икры, обтянута сеткой 5 с размерами ячеек меньше размеров икры и больше размеров предличинки, зафиксирована на внутренних сторонах емкости примерно в 6 см от ее дна. При инкубации икры осетровых рыб размер ячеек сетки составляет 1×1 мм. Отличительной особенностью установки является наличие крышки 6, выполненной из стекла органического цветного красного толщиной 3 мм (марка ТОСП, ГОСТ 17622–72), покрытого поляроидной пленкой 7. Крышка 6 прикреплена к стенке емкости, противоположной сливному носику 3, с возможностью поворота ее на угол 0–180° вокруг оси 8. Установка включает в себя микропроцессор 9 для оценки оптимальной дозы поляризованного излучения, воздействующего на икру. Микропроцессор 9 электрически связан с установленными под крышкой датчиком 10 положения крышки и фотоприемником 11, приемное окно (на рисунке не показано) которого направлено в сторону крышки 6. Фотоприемник 11 срабатывает посредством датчика 10 положения крышки при ее закрытом положении. Микропроцессор обеспечивает подачу аудио- и видеосигнала по достижении дозы поляризованного излучения, оптимальной для эмбрионального и постэмбрионального развития особей.

В предлагаемом устройстве в качестве источника излучения может использоваться как солнечный свет, так и искусственное освещение, применяемое в помещении. Требуемый спектральный диапазон излучения из широкополосного белого света выделяется с помощью стекла органического цветного красного, выступающего в качестве оптического фильтра и являющегося крышкой 6 инкубатора. Поляроидная пленка 7, покрывающая крышку 6, предназначена для преобразования света с естественной поляризацией в линейно поляризованный свет. При открытом положении крышки икра подвергается действию неполяризованного света, который является биологически не активным и не влияет на эмбриональное и постэмбриональное развитие особей. При закрытом положении крышки икра подвергается действию поляризованного излучения, которое в определенном диапазоне интенсивностей оказывает стимулирующее действие на развитие гидробионтов.

Работа установки для инкубации икры осуществляется следующим образом. Осетровая оплодотворенная икра после обесклеивания размещается на рамке 4 с сеткой 5 с размером ячеек 1×1 мм. Диаметр икры превышает размер ячеек. Процесс инкубации протекает при темпе-

ратуре  $(16 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение  $(10 \pm 1)$  сут. Предварительно емкость 1 через патрубок 2 заполняют водой таким образом, чтобы икра находилась под слоем воды примерно 0,5–0,8 см. Крышка 6, выполненная из органического стекла, покрытого поляроидной пленкой 7, находится в закрытом или открытом состоянии. На стадии от смыкания нервных валиков до начала пульсации сердца (24–28-я стадии эмбрионального развития) икра через крышку подвергается воздействию поляризованного излучения. Величина стимулирующего действия, индуцируемого поляризованным излучением, в значительной степени зависит от дозы света. Поскольку интенсивность света (как солнечного, так и искусственного) может сильно изменяться в зависимости от времени суток, поры года, облачности, количества включенных источников излучения (ламп), срока их эксплуатации и высоты расположения над установкой для инкубации икры, то для контроля оптимальной дозы поляризованного излучения установка имеет микропроцессор 9, электрически связанный с датчиком 10 положения крышки и фотоприемником 11, установленными под крышкой 6. Показания микропроцессора 9 откалиброваны таким образом, что обеспечивают контроль воздействующей дозы поляризованного излучения, прошедшего через крышку 6 и поляроидную пленку 7. Причем срабатывание фотоприемника происходит после перевода крышки в положение «закрыто». При открытом положении крышки икра подвергается действию неполяризованного излучения, которое биологически не активно. При закрытом положении крышки после набора оптимальной дозы на микропроцессоре загорается сигнальный светодиод (видеосигнал), а также включается звуковой сигнал (аудиосигнал), свидетельствующие о необходимости прекращения воздействия поляризованного излучения. Прекращение воздействия биологически активного поляризованного излучения осуществляется путем поднятия крышки.

В течение всего периода инкубации осуществляется принудительная смена воды, которая достигается ее поступлением по патрубку 2 и стоком через сливной носик 3.

Выклюнувшиеся личинки свободно плавают в толще воды всей установки. После завершения выклева рамку с сеткой с остатками оболочек икры убирают, а личинки извлекают из установки путем слива воды через сливной носик и помещают в бассейн или садок для подращивания.

В табл. 13 приведены значения выхода 1-дневных личинок из оплодотворенной икры, которая инкубировалась в емкости, не содержащей крышки, покрытой поляроидной пленкой (контрольная группа,

прототип), и в предлагаемой установке для инкубации икры, обеспечивающей воздействие на нее поляризованным светом (опытная группа).

Таблица 13. Значения выхода 1-дневных личинок из оплодотворенной икры, инкубированной под воздействием поляризованного и неполяризованного излучения

Группа	Процент выживших личинок на стадии выклева	Достоверность отличий от контроля
Контрольная (прототип)	$69,0 \pm 1,0$	–
Опытная (предлагаемое устройство)	$75,4 \pm 2,3$	$P < 0,001$

Из представленных данных следует, что инкубация оплодотворенной осетровой икры в предлагаемой установке приводит к повышению, по сравнению с прототипом, выхода личинок из оплодотворенной икры. Так, если в контрольной группе выживаемость на стадии выклева составляет  $(69 \pm 1,0)$  %, то в опытной группе –  $(75,4 \pm 2,3)$  % (достоверность отличий от контроля  $P < 0,001$ ).

Стимулирующее действие поляризованного излучения не только влияет на выход 1-дневных личинок из оплодотворенной икры, но и приводит к увеличению (по сравнению с прототипом) размерно-весовых показателей молоди рыб, полученной из облученной икры.

В табл. 14 приведены размерно-весовые показатели 50-дневной молоди осетровых рыб, эмбрионы которых инкубировались в емкости, не содержащей крышки с поляроидной пленкой (контрольная группа, прототип), и в предлагаемой установке для инкубации икры, обеспечивающей воздействие на нее поляризованным светом (опытная группа).

Таблица 14. Значения размерно-весовых показателей 50-дневной молоди осетровых рыб, эмбрионы которых инкубировались под воздействием поляризованного и неполяризованного излучения

Группа	Средняя масса $M$ , мг	Величина стимулирующего действия $\gamma_m$ , %	Средняя длина $L$ , мм	Величина стимулирующего действия $\gamma_L$ , %
Контрольная (прототип)	$566,3 \pm 9,5$	100	$47,0 \pm 0,5$	100
Опытная (предлагаемое устройство)	$635,9 \pm 15,3$	$112,3 \pm 2,7^*$	$52,5 \pm 0,3$	$111,7 \pm 0,7^{***}$

\* $P < 0,05$ .

\*\*\* $P < 0,001$ .

Из представленных данных следует, что инкубация оплодотворенной осетровой икры в предлагаемой установке приводит к увеличению, по сравнению с прототипом, размерно-весовых показателей молоди осетровых рыб. Так, длина особей в контрольной группе составила  $(47,0 \pm 0,5)$  мм, а в опытной –  $(52,5 \pm 0,3)$  мм, т. е. величина стимулирующего действия ( $\gamma_d = (L_o / L_k) 100$  %, где  $L_o$  – длина молоди осетровых рыб в опытной группе, мм;  $L_k$  – длина молоди осетровых рыб в контрольной группе, мм) составляет  $(111,7 \pm 0,7)$  %, достоверность отличий от контроля  $P < 0,001$ . Масса молоди в контрольной группе составила  $(566,3 \pm 9,5)$  мг, а в опытной –  $(635,9 \pm 15,3)$  мг, т. е. величина стимулирующего действия ( $\gamma_m = (M_o / M_k) 100$  %, где  $M_o$  – масса молоди осетровых рыб в опытной группе, мг;  $M_k$  – масса молоди осетровых рыб в контрольной группе, мг) составляет  $(112,3 \pm 2,7)$  %, достоверность отличий от контроля  $P < 0,05$ .

Таким образом, заявленная установка позволяет обеспечить повышение эффективности искусственного воспроизводства и выращивания осетровых рыб за счет повышения выживаемости эмбрионов и личинок, увеличения размерно-весовых показателей молоди осетровых рыб, а также оптимизации технологии товарной аквакультуры при низкой стоимости оборудования для ее реализации.

## **2.10. Лазерно-оптический прибор для инкубации икры «Sturgeon»**

На основании результатов полученных исследований был спроектирован лазерно-оптический прибор для воздействия на икру рыб (преимущественно осетровых видов).

Прибор позволяет осуществлять воздействие на икру непосредственно в инкубационном аппарате, не прерывая технологического процесса инкубации.

Общий вид прибора представлен на рис. 111. Расположение прибора на инкубационных аппаратах лоткового типа показано на рис. 112–114.

Технической задачей разработанной установки является повышение эффективности инкубации, выживаемости эмбрионов рыб в процессе инкубации, выхода личинок из оплодотворенной икры и качества получаемого рыбопосадочного материала.

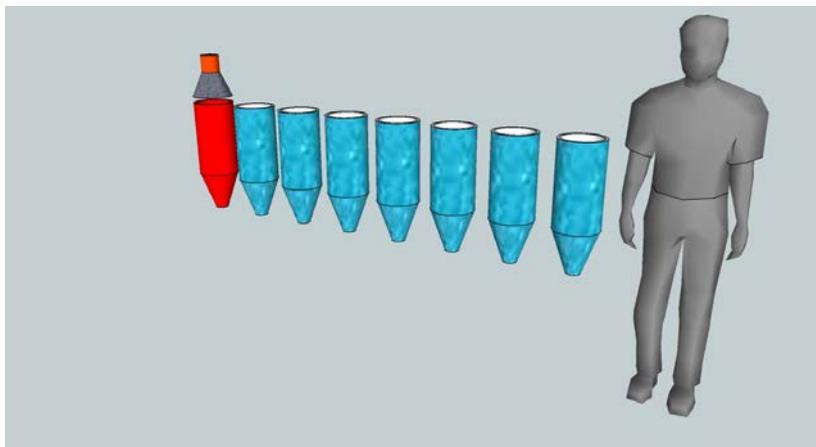


Рис. 111. Общий вид лазерно-оптического прибора «Sturgeon» для инкубационных аппаратов Вейса

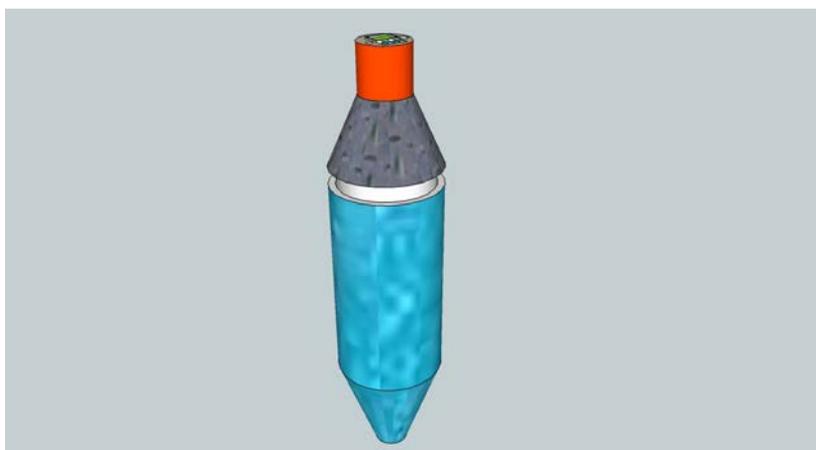


Рис. 112. Расположение лазерно-оптического прибора «Sturgeon» на инкубационном аппарате Вейса

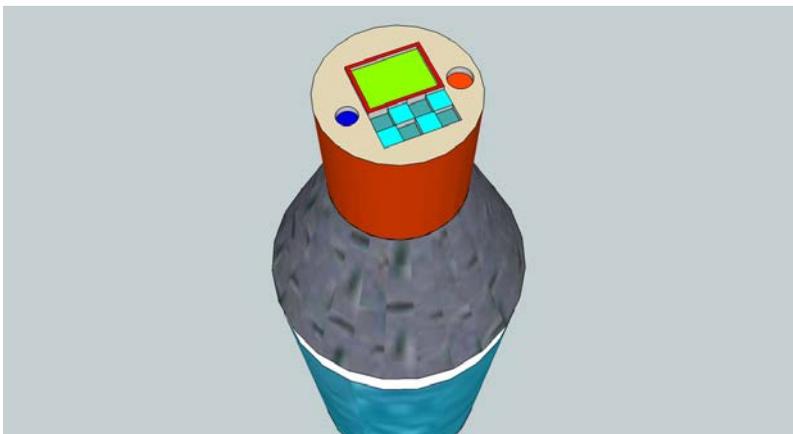


Рис. 113. Общий вид расположения лазерно-оптического прибора «Sturgeon» на инкубационном аппарате Вейса



Рис. 114. Лазерно-оптический прибор для инкубации икры «Sturgeon», расположенный на инкубационном аппарате «Вейса»

Поставленная задача решается с помощью установки для инкубации икры «Sturgeon», включающей открытую сверху, прозрачную герметичную емкость (как правило, изготовленную из стекла или любого другого материала), выполненную в форме перевернутой бутылки без дна с нижним патрубком для подачи воды и патрубком в виде сливного носика для ее сброса, расположенным вблизи верхней кромки емкости. Над открытой герметичной емкостью располагается лазерно-оптическое устройство для воздействия на икру и личинок рыб, включающее источники лазерного и светодиодного излучения, а также приборы для включения излучения и регулирования времени и режима воздействия. Модуль оптического излучения обращен излучающей частью к воде, заполняющей емкость таким образом, что диаграмма направленности излучения перпендикулярна плоскости поверхности воды. Данный модуль электрически связан с модулем питания и управления параметрами воздействующего излучения и его длительностью.

Конструктивно светодиодный источник оптического модуля обеспечивает получение поляризованного излучения.

Предлагаемое устройство включает следующие элементы:

- 1) герметичная емкость;
- 2) нижний патрубок;
- 3) сливной носик;
- 4) модуль оптического излучения;
- 5) модуль питания и управления.

Прозрачная герметичная емкость заполняется водой с помощью нижнего патрубка. Сброс воды из емкости осуществляется через сливной носик, расположенный вблизи верхней кромки ее. Над открытой герметичной емкостью располагается модуль оптического излучения на базе полупроводниковых лазеров и (или) светодиодных источников для воздействия на икру и личинок рыб, электрически связанный с модулем питания и управления параметрами воздействующего излучения и его длительностью.

В герметичную емкость загружается икра рыб. Расход подаваемой воды и ее качество зависят от рыбоводно-технологических параметров, необходимых для конкретного вида рыб. За счет того, что икра тяжелее воды, нормативный поток воды создает благоприятные условия для водо- и газообмена, но не допускает выброс икры за пределы емкости. Над открытой герметичной емкостью располагается модуль оптического излучения для воздействия на икру и личинок рыб. Мо-

дуль оптического излучения электрически связан с модулем питания и управления параметрами воздействующего излучения и его длительностью.

Модуль оптического излучения может быть как механически связан с корпусом герметичной емкости, так и выполнен отдельно от него. В первом случае модуль оптического излучения механически фиксируют к корпусу герметичной емкости, во втором – в специальном держателе. При фиксации модуля оптического излучения к корпусу герметичной емкости обеспечивается неизменность условий воздействия излучения на икру и личинок рыб в процессе фотовоздействия. Во втором случае, когда модуль оптического излучения механически не связан с герметичной емкостью, легко реализуется поочередное воздействие оптическим излучением на икру и личинок рыб в различных герметичных емкостях путем перемещения модуля оптического излучения от одной емкости к другой.

Конструктивно установку для инкубации икры и, в частности, модуль оптического излучения выполняют в различных вариантах.

1. Модуль оптического излучения выполнен на базе полупроводникового лазера с оптическим преобразователем пучка лазерного излучения, формирующим на поверхности воды световое пятно, соответствующее внутреннему диаметру герметичной емкости. В данном случае излучатель полупроводникового лазера с оптическим преобразователем пучка лазерного излучения располагают вдоль оси симметрии герметичной емкости на таком расстоянии от поверхности воды, чтобы размер светового пятна на поверхности воды соответствовал внутреннему диаметру герметичной емкости. При этом расстояние от поверхности излучателя до поверхности воды определяется расходимостью излучения. Поскольку излучение полупроводникового лазера является поляризованным, то такое воздействие на биообъекты при соответствующем выборе параметров оптического излучения обеспечивает стимулирующее влияние на эмбриональное и постэмбриональное развитие особей.

2. Модуль оптического излучения выполнен на базе матрицы одинаковых полупроводниковых лазеров (лазеров одной длины волны), которая может быть сформирована отдельно расположенными лазерными излучателями, каждый из которых содержит оптические преобразователи пучка лазерного излучения, формирующие на поверхности воды перекрывающиеся световые пятна. При этом суммарное световое пятно, сформированное матрицей полупроводниковых лазеров с оптическими преобразователями пучка, соответствует внутреннему диа-

метру герметичной емкости. Наряду с этим матрица лазерных излучателей может быть выполнена путем объединения в единый излучатель отдельных лазерных диодов или их линеек с общим для целой матрицы оптическим преобразователем пучка, формирующим на поверхности воды световое пятно, соответствующее внутреннему диаметру герметичной емкости.

3. Модуль оптического излучения выполнен на базе матрицы полупроводниковых лазеров различных длин волн с оптическими преобразователями пучка лазерного излучения, формирующими на поверхности воды световое пятно, соответствующее внутреннему диаметру герметичной емкости, при этом модуль питания и управления параметрами воздействующего излучения и его длительностью обеспечивает комбинированное последовательное воздействие излучением различных длин волн и регулирование длительности паузы между воздействиями. Данный вариант исполнения установки для инкубации икры обеспечивает возможность комбинированного воздействия на гидробионты лазерным излучением различного спектрального диапазона, что значительно усиливает стимулирующее действие физического фактора.

4. Модуль оптического излучения выполнен на базе светодиодного источника, который совместно с оптическим преобразователем пучка излучения формирует на поверхности воды световое пятно, соответствующее внутреннему диаметру герметичной емкости. В данном случае светодиодный излучатель с оптическим преобразователем пучка оптического излучения располагают вдоль оси симметрии герметичной емкости на таком расстоянии от поверхности воды, чтобы размер светового пятна на поверхности воды соответствовал внутреннему диаметру герметичной емкости. При этом расстояние от поверхности светодиодного излучателя до поверхности воды определяется расходом излучения.

5. Для повышения интенсивности светового воздействия на гидробионты модуль оптического излучения одного спектрального диапазона может быть выполнен на базе матрицы светодиодных источников с оптическими преобразователями пучка излучения, формирующими на поверхности воды световое пятно, соответствующее внутреннему диаметру герметичной емкости. Матрица светодиодных источников может быть сформирована отдельно расположенными светодиодными излучателями, каждый из которых содержит оптические преобразователи пучка оптического излучения, формирующие на поверхности воды перекрывающиеся световые пятна. При этом суммарное световое

пятно, сформированное матрицей светодиодных излучателей с оптическими преобразователями пучка, соответствует внутреннему диаметру герметичной емкости. Наряду с этим матрица светодиодных излучателей может быть выполнена путем объединения в единый излучатель отдельных светодиодов или их линеек с общим для целой матрицы оптическим преобразователем пучка, формирующим на поверхности воды световое пятно, соответствующее внутреннему диаметру емкости.

6. Модуль оптического излучения выполнен на базе матрицы светодиодных излучателей различного спектрального диапазона, формирующих совместно с оптическими преобразователями пучка излучения на поверхности воды световое пятно, соответствующее внутреннему диаметру герметичной емкости. При этом модуль питания и управления параметрами воздействующего излучения и его длительностью обеспечивает комбинированное последовательное воздействие излучением различного спектрального диапазона и регулирование длительности паузы между воздействиями. Данный вариант исполнения установки для инкубации икры обеспечивает возможность комбинированного воздействия на гидробионты оптическим излучением различного спектрального диапазона, что значительно усиливает стимулирующее действие физического фактора.

7. Поскольку, как правило, излучение светодиодных источников является неполяризованным, а биологическое действие оптического излучения зависит от степени его поляризации, то разработан еще один вариант исполнения установки для инкубации икры, в котором предполагается расположение на выходе светодиодного источника или на выходе оптического преобразователя пучка оптического излучения поляризационной пленки таким образом, чтобы плоскость поляризационной пленки была перпендикулярна диаграмме направленности излучения светодиодного источника. Это позволит обеспечить воздействие на гидробионты линейно поляризованного излучения.

Так как использование поляризационной пленки повышает регуляторное действие оптического излучения, то данный вариант исполнения установки для инкубации икры на базе светодиодных излучателей представляется наиболее целесообразным. Однако в этом случае более половины мощности излучения светодиодных источников поглощается самой пленкой, что приводит к дополнительным энергозатратам.

По этой причине в одном из вариантов исполнения установки для инкубации икры предполагается, что конструктивно светодиодный

источник оптического модуля обеспечивает получение поляризованного излучения без использования поляризационной пленки. Светодиодные устройства для получения поляризованного излучения активно разрабатываются в последние годы.

Воздействие лазерным излучением или излучением светодиодных источников осуществляют на рекомендуемых стадиях, в рекомендуемых дозировках в зависимости от конкретного вида рыб.

В табл. 15 приведены значения выхода 1-дневных личинок из оплодотворенной икры для двух групп. В одной группе (контрольной) икра инкубировалась в герметичной емкости, которая не подвергалась воздействию оптического излучения, а в другой (опытной) – в заявленной установке для инкубации икры, обеспечивающей воздействие на нее лазерным излучением низкой интенсивности.

**Таблица 15. Значения выхода 1-дневных личинок из оплодотворенной икры, инкубированной под воздействием оптического излучения и лазерного излучения низкой интенсивности**

Группа	Процент выживших личинок на стадии выклева	Достоверность отличий от контроля
Контрольная (прототип)	$69,0 \pm 2,7$	–
Опытная (предлагаемое устройство)	$85,4 \pm 4,3$	$P < 0,001$

Из представленных данных следует, что инкубация оплодотворенной осетровой икры в заявленной установке приводит к повышению, по сравнению с прототипом, выхода личинок из оплодотворенной икры. Так, если в контрольной группе выживаемость на стадии выклева составила  $(69,0 \pm 2,7) \%$ , то в опытной –  $(85,4 \pm 4,3) \%$ , достоверность отличий от контроля  $P < 0,001$ .

Стимулирующее действие поляризованного излучения не только влияет на выход 1-дневных личинок из оплодотворенной икры, но и приводит к увеличению (по сравнению с прототипом) размерно-весовых показателей молоди рыб, полученных из облученной икры.

В табл. 16 приведены размерно-весовые показатели 50-дневной молоди осетровых рыб для двух групп эмбрионов. В одной группе (контрольной) эмбрионы инкубировались в герметичной емкости, которая не подвергалась воздействию оптического излучения, а в другой (опытной) – в заявленной установке для инкубации икры, обеспечивающей воздействие на нее лазерным излучением низкой интенсивности.

Таблица 16. Значения размерно-весовых показателей 50-дневной молоди осетровых рыб, эмбрионы которых инкубировались под воздействием оптического излучения и лазерного излучения низкой интенсивности

Группа	Средняя масса $M$ , мг	Величина стимулирующего действия $\gamma_m$ , %	Средняя длина $L$ , мм	Величина стимулирующего действия $\gamma_d$ , %
Контрольная (прототип)	530,3 ± 8,2	100	44,0 ± 0,9	100
Опытная (предлагаемое устройство)	735,6 ± 10,0	138,7 ± 7,7*	58,5 ± 0,8	132,9 ± 0,6*

\* $P < 0,05$ .

Из представленных данных следует, что инкубация оплодотворенной осетровой икры в предлагаемой установке приводит к увеличению, по сравнению с прототипом, размерно-весовых показателей молоди осетровых рыб. Так, длина особей в контрольной группе составила (44,0 ± 0,9) мм, а в опытной – (58,5 ± 0,8) мм, т. е. величина стимулирующего действия ( $\gamma_d = (L_o / L_k) 100$  %, где  $L_o$  – длина молоди осетровых рыб в опытной группе, мм;  $L_k$  – длина молоди осетровых рыб в контрольной группе, мм) составляет (132,9 ± 0,6) %, достоверность отличий от контроля  $P < 0,05$ . Масса молоди в контрольной группе составила (530,3 ± 8,2) мг, а в опытной – (735,6 ± 10,0) мг, т. е. величина стимулирующего действия ( $\gamma_m = (M_o / M_k) 100$  %, где  $M_o$  – масса молоди осетровых рыб в опытной группе, мг;  $M_k$  – масса молоди осетровых рыб в контрольной группе, мг) составляет (138,7 ± 7,7) %, достоверность отличий от контроля  $P < 0,05$ .

Таким образом, заявленная технология позволяет обеспечить повышение эффективности искусственного воспроизводства и выращивания осетровых рыб за счет повышения выживаемости эмбрионов и личинок, увеличения размерно-весовых показателей молоди рыб, а также оптимизации технологии товарной аквакультуры при низкой стоимости обородования для ее реализации.

## 2.11. Рекомендации по использованию эмбрионов осетровых рыб в исследованиях *in vitro* (на примере изучения поляризации и когерентности оптического излучения)

### 2.11.1. Исследование зависимости биологического действия излучения от типа его поляризации

Количественные данные, свидетельствующие о различии фотобиологических эффектов (размерно-весовые характеристики и показатели жизнестойкости 50-дневной молоди осетровых рыб в неблагоприятных условиях среды обитания), индуцированных воздействием на эмбрионы при оптимальных условиях линейно-поляризованным и неполяризованным квазимонохроматическим излучением ( $P = 2,9 \text{ мВт/см}^2$ ,  $t = 60 \text{ с}$ ) красного светодиода с длиной волны  $\lambda = 631 \text{ нм}$  ( $\Delta\lambda = 15 \text{ нм}$ ), представлены в табл. 17.

Таблица 17. Влияние облучения эмбрионов на стадии органогенеза линейно поляризованным и неполяризованным квазимонохроматическим светом светодиодного источника на показатели жизнестойкости 50-дневной молоди осетровых рыб в неблагоприятных условиях среды обитания

Анализируемый параметр	Численное значение		
	Контроль	Воздействие линейно поляризованным излучением	Воздействие неполяризованным излучением
Устойчивость к дефициту кислорода, мг/мл	2,13 ± 0,02	1,78 ± 0,05	2,06 ± 0,02
Термоустойчивость, мин	145,30 ± 1,10	159,70 ± 4,10	149,80 ± 2,20
Токсикоустойчивость, % выживших особей	0	5,60 ± 1,10**	2,20 ± 1,10***

\*\*P < 0,001.

\*\*\*P < 0,05.

Из табл. 17 видно, что 50-дневная молодь рыб, полученная из эмбрионов, подвергнутых кратковременному однократному воздействию поляризованного света, значительно превосходит контрольных особей по устойчивости к дефициту кислорода в среде обитания, терморезистентности и токсикоустойчивости. Достоверность отличий от контроля  $P < 0,001$ . По некоторым из указанных показателей достоверные отличия от контроля ( $P < 0,05$ ) вызывает и неполяризованное излучение. Однако при тех же условиях облучения величина стимулирующе-

го действия для излучения с естественной поляризацией значительно ниже по всем показателям, чем в случае использования излучения с линейной поляризацией. При этом если летальный исход за счет нехватки кислорода в среде обитания для особей контрольной группы наблюдается при пороговой концентрации  $[O_2]_к = (2,13 \pm 0,02)$  мг/мл, то соответствующие показатели для группы рыб, эмбрионы которых подвергались воздействию поляризованного и неполяризованного излучения, составляют:  $[O_2]_о = (1,78 \pm 0,05)$  мг/мл ( $\gamma_{O_2} = (83,6 \pm 3,0) \%$ ) и  $[O_2]_о = (2,06 \pm 0,02)$  мг/мл ( $\gamma_{O_2} = (96,5 \pm 0,8) \%$ ) соответственно. То есть молодь, полученная из облученных эмбрионов, характеризуется повышенной жизнестойкостью (по сравнению с контрольной группой) в среде обитания с недостаточным содержанием кислорода, и этот эффект наиболее выражен для поляризованного излучения. Различие в действии линейно поляризованного и неполяризованного света наблюдается и при контроле токсикоустойчивости и терморезистентности молоди. Так, если после воздействия токсиканта (сульфата меди в концентрации 0,1 мг/л) в течение 7 сут наблюдается гибель всех особей контрольной группы ( $\gamma_{токс} = 0$ ), то среди молоди, полученной из эмбрионов, облученных поляризованным и неполяризованным светом, процент выживших особей составляет  $(5,6 \pm 1,1)$  и  $(2,2 \pm 1,1) \%$  соответственно. При контроле параметров терморезистентности отмечается, что гибель молоди, эмбрионы которой подвергались воздействию поляризованного излучения, наблюдается при более продолжительном воздействии ( $t_o = (159,7 \pm 4,1)$  мин,  $\gamma_t = (109,9 \pm 2,8) \%$ ) на нее экстремальной температуры в  $32^\circ\text{C}$ , чем у особей, эмбрионы которых облучались неполяризованным светом ( $t_o = (149,8 \pm 2,2)$  мин,  $\gamma_t = (103,1 \pm 1,5) \%$ ) или у особей контрольной группы ( $t_k = (145,3 \pm 1,1)$  мин).

С учетом сильной зависимости регуляторного действия оптического излучения от дозовой нагрузки представляет интерес проведение сравнения биологического действия линейно поляризованного и неполяризованного света в зависимости от времени облучения эмбрионов. Дозовые кривые, отражающие влияние облучения эмбрионов линейно поляризованным (кривая 1) и неполяризованным (кривая 2) светом квазимонохроматического красного светодиода ( $\lambda = 631$  нм,  $\Delta\lambda = 15$  нм,  $P = 2,9$  мВт/см<sup>2</sup>) на их устойчивость к неблагоприятным условиям среды обитания (дефициту кислорода, экстремальной температуре, токсикантам), представлены на рис. 115.

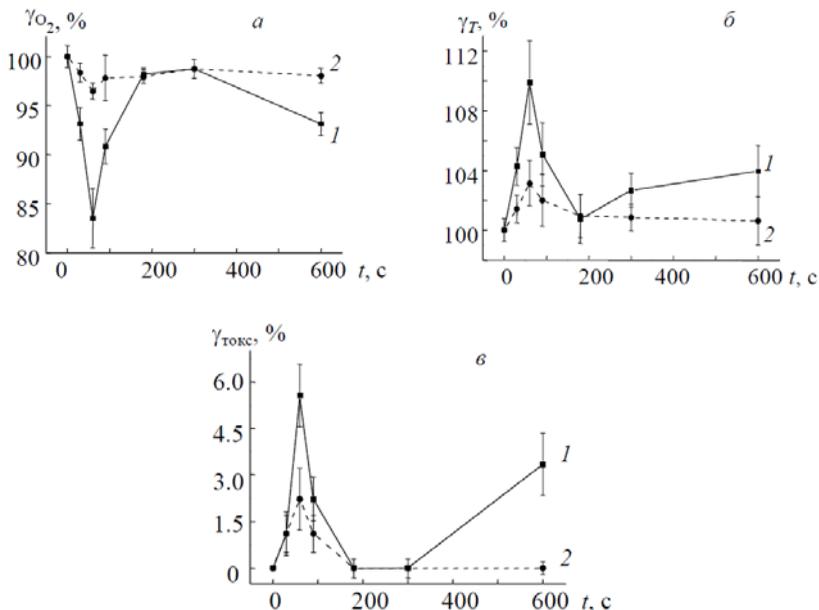


Рис. 115. Влияние времени облучения оплодотворенной икры на устойчивость 50-дневной молоди осетровых рыб к дефициту кислорода (а), действию экстремальной температуры (б) и токсикантов в среде обитания (в) для линейно поляризованного и неполяризованного квазимонохроматического красного светодиода

Из графиков следует, что все приведенные дозовые зависимости представляют собой кривые с ярко выраженными максимумами стимулирующего действия при  $t = 60$  с (доза  $E = 0,17$  Дж/см<sup>2</sup>) в узком диапазоне доз (0–0,5 Дж/см<sup>2</sup>). Однако, по всей видимости, кроме данного максимума в дозовой кривой могут регистрироваться и другие точки экстремумов, соответствующие оптимальному биологическому действию света. На это, в частности, указывает достоверно наблюдаемое при действии поляризованного излучения увеличение размерно-весовых показателей и параметров жизнестойкости молоди при времени облучения икры, равном 600 с (доза  $E = 1,7$  Дж/см<sup>2</sup>). При этом следует отметить, что для неполяризованного излучения при использовании в качестве тестов параметров токсикоустойчивости и терморезистентности, а также устойчивости молоди рыб к дефициту кислорода при указанной дозе фотобиологический эффект отсутствует. Обращает на себя внимание тот факт, что в целом для всех контролируемых

в настоящей работе параметров молоди осетровых рыб величина фотобиологического эффекта, индуцируемого неполяризованным излучением, весьма незначительна и ее достоверное отличие от контроля ( $P < 0,05$ ) наблюдается лишь при оптимальных условиях облучения ( $t = 60$  с,  $E = 0,17$  Дж/см<sup>2</sup>).

Таким образом, совокупность представленных данных свидетельствует о том, что наблюдаются существенные различия в биологической активности линейно поляризованного и неполяризованного света в отношении эмбрионов осетровых рыб при контроле размерно-весовых показателей и параметров жизнестойкости в неблагоприятных условиях среды обитания 50-дневной молоди рыб, полученной из указанных эмбрионов.

Как известно, важная информация о первичных механизмах фотобиологических процессов может быть получена в результате анализа результатов влияния на биообъекты излучения с линейной и круговой поляризацией. Количественные данные, отражающие действие на эмбрионы лазерного излучения ( $\lambda = 632,8$  нм,  $P = 2,9$  мВт/см<sup>2</sup>,  $t = 60$  с) с линейной, круговой и естественной поляризациями и основанные на контроле весовых показателей 50-дневной молоди рыб, а также ее устойчивости к дефициту кислорода в среде обитания, представлены на рис. 116.

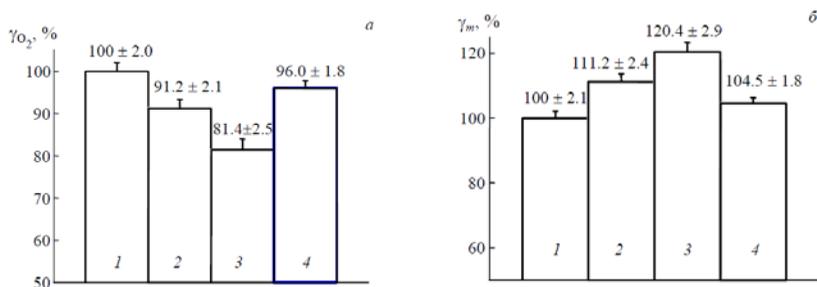


Рис. 116. Влияние типа поляризации лазерного излучения, воздействующего на оплодотворенную икру, на устойчивость 50-дневной молоди осетровых рыб к дефициту кислорода (а) и массу особей (б): 1 – контроль; 2 – циркулярно поляризованное излучение; 3 – линейно поляризованное излучение; 4 – неполяризованное излучение

Из рис. 116, а видно, что облучение оплодотворенной икры, отражающееся на эмбриональном и постэмбриональном развитии особей,

приводит к снижению (по сравнению с контролем) пороговых концентраций кислорода, при которых наблюдается гибель стандартной молодежи. При этом максимальный стимулирующий эффект ( $\gamma_{O_2} = (81,4 \pm 2,5) \%$ , достоверность отличий от контроля  $P < 0,001$ ) наблюдается при воздействии линейно поляризованного излучения, минимальный – неполяризованного ( $\gamma_{O_2} = (96,0 \pm 1,8) \%$ ,  $P < 0,05$ ); излучение с круговой поляризацией по биологической активности занимает промежуточное значение ( $\gamma_{O_2} = (91,2 \pm 2,1) \%$ ,  $P < 0,001$ ). Аналогичная закономерность прослеживается и при контроле массы тела молодежи (рис. 116, б). Стимулирующий эффект в данном случае заключается в превышении весовых показателей особей, полученных из облученных эмбрионов, над показателями особей, полученных из эмбрионов, не подвергавшихся действию излучения. При этом показатели стимулирующего действия, индуцированного излучением с линейной, круговой и естественной поляризациями, характеризуются следующими численными значениями:  $\gamma_m = (120,4 \pm 2,9) \%$ ,  $P < 0,001$ ;  $\gamma_m = (111,2 \pm 2,4) \%$ ,  $P < 0,001$ ;  $\gamma_m = (104,5 \pm 1,8) \%$ ,  $P < 0,05$ .

Следует отметить, что, согласно полученным данным, достоверные отличия наблюдаются не только между каждой опытной группой и контролем, но и между опытными группами ( $P < 0,001$ ), что свидетельствует о различной биологической активности линейно поляризованного, циркулярно поляризованного и неполяризованного излучения.

### **2.11.2. Исследование зависимости биологической активности излучения от его временной когерентности**

Влияние степени когерентности поляризованного оптического излучения на его биологическую активность иллюстрируют данные, представленные на рис. 117.

На диаграмме, показанной на рисунке, приведены результаты сравнительных экспериментов (основанных на контроле массы 50-дневной молодежи рыб) при воздействии на эмбрионы монохроматическим лазерным излучением ( $\lambda = 632,8$  нм,  $\Delta\lambda = 0,02$  нм,  $L_{\text{ког}} \sim 2000$  мкм), квази-монохроматическим излучением красного светодиода ( $\lambda = 631$  нм,  $\Delta\lambda = 15$  нм,  $L_{\text{ког}} \sim 26$  мкм) и широкополосным излучением белого светодиода ( $\lambda = 420\text{--}800$  нм,  $\Delta\lambda = 130$  нм,  $L_{\text{ког}} < 2,5$  мкм). Для всех вариантов облучения  $P = 2,9$  мВт/см<sup>2</sup>,  $t = 60$  с. Из представленных данных

видно, что биологические эффекты, индуцированные излучением монохроматического лазерного ( $\gamma_m = (120,4 \pm 2,9) \%$ ,  $P < 0,001$ ) и квазимонохроматического светодиодного ( $\gamma_m = (118,6 \pm 3,7) \%$ ,  $P < 0,001$ ) источников, практически не отличаются. Однако переход к широкополосному излучению сопровождается заметным снижением биологического действия:  $\gamma_m = (111,1 \pm 1,8) \%$ ,  $P < 0,001$ .

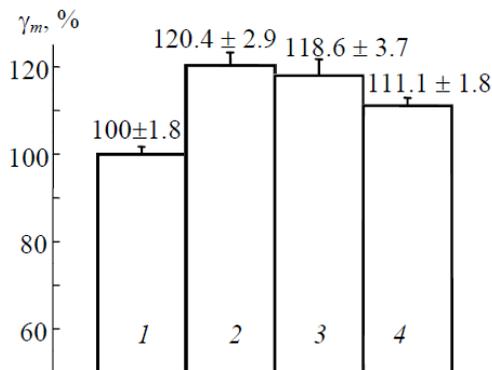


Рис. 117. Влияние степени когерентности поляризованного оптического излучения, воздействующего на оплодотворенную икру, на массу 50-дневной молоди осетровых рыб: 1 – контроль; 2 – лазерное излучение; 3 – квазимонохроматическое излучение красного светодиода; 4 – широкополосное излучение белого светодиода

Полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют о выраженной биологической активности низкоинтенсивного излучения красной области спектра, заключающейся в способности света влиять на постэмбриональное развитие осетровых рыб при кратковременном однократном воздействии на эмбрионы на стадии органогенеза. Экспериментально это проявляется в повышении параметров жизнестойкости стандартной молоди осетровых рыб к воздействию неблагоприятных факторов среды обитания (дефициту кислорода, экстремальной температуре, токсикантам), а также в стимуляции размерно-весовых показателей рыб по сравнению с особями контрольных групп, эмбрионы которых не подвергались воздействию оптического излучения. Эффекты, индуцируемые оптическим излучением, характеризуются высоким уровнем достоверности. Как следует из полученных данных, наиболее существенные различия между показателями опытных и контрольных групп наблюдаются при использовании в качестве тестов

устойчивости 50-дневной молодежи к дефициту кислорода в среде обитания, а также при контроле массы тела особей. По этой причине большинство сравнительных исследований эффективности воздействия линейно, циркулярно поляризованного и неполяризованного излучения, а также излучения, характеризующегося различной степенью временной когерентности, проведено с использованием указанных тестов.

На основании проведенных исследований, выполненных в условиях воздействия на эмбрионы линейно поляризованным и неполяризованным квазимонохроматическим излучением ( $\lambda = 631$  нм,  $\Delta\lambda = 15$  нм) светодиодного источника, а также лазерным излучением ( $\lambda = 632,8$  нм,  $\Delta\lambda = 0,02$  нм) с линейной, круговой и естественной поляризациями одинаковой интенсивности ( $P = 2,9$  мВт/см<sup>2</sup>), сделан вывод об определяющем значении поляризации излучения в реализации его биологического действия. Максимальный стимулирующий эффект (на размерно-весовые характеристики и показатели жизнестойкости) наблюдается при воздействии линейно поляризованным излучением; фотобиологический эффект, индуцируемый в том же дозовом интервале светом естественной поляризации (т. е. неполяризованным), значительно менее выражен; величина стимулирующего действия циркулярно поляризованного излучения занимает промежуточное значение. При оптимальных условиях воздействия на эмбрионы светом красной области спектра ( $P = 2,9$  мВт/см<sup>2</sup>,  $t = 60$  с) показатели  $\gamma_{0,2}$ , характеризующие устойчивость молодежи рыб к нехватке кислорода в среде обитания, в опытной группе превышают таковые для контрольной на 16–19 % ( $P < 0,001$ ) при воздействии линейно поляризованным, на 9–11 % ( $P < 0,001$ ) при воздействии циркулярно поляризованным и на 4–5 % ( $P < 0,001$ ) при воздействии неполяризованным излучением. Обращает на себя внимание тот факт, что при воздействии неполяризованным излучением стимулирующее действие хотя и является достоверным ( $P < 0,001$ ), однако величина эффекта очень незначительна.

Как уже отмечалось, в исследованиях, выполненных в условиях *in vitro* на клетках крови или культивируемых клетках, неполяризованное излучение не влияло (в отличие от света с линейной поляризацией) на структурно-функциональные характеристики клеточных мембран и скорость клеточной пролиферации. В этой связи нельзя исключить, что при действии неполяризованного излучения на оплодотворенную икру осетровых рыб (эмбрионы) происходит его частичная поляризация при прохождении через слой меланина, покрывающий икру и при-

дающий ей характерную черную окраску. Как известно, меланин способен формировать сложные нанокolloидные ансамбли мономерных и полимерных молекул и за счет дихроизма поглощения его пленки могут выполнять функцию поляроида. Можно ожидать, что индуцируемая тонким слоем меланина частичная поляризация света и ответственна за регистрируемый фотобиологический эффект при действии на эмбрионы неполяризованного излучения.

Сравнение результатов исследований, выполненных с использованием излучения различной степени временной когерентности, показало, что биологические эффекты (размерно-весовые характеристики и показатели устойчивости рыб к нехватке кислорода среды обитания), индуцируемые линейно поляризованным излучением монохроматического лазерного (гелий-неоновый лазер,  $\lambda = 632,8$  нм,  $\Delta\lambda \approx 0,02$  нм, длина когерентности  $L_{\text{ког}} \sim 2\,000$  мкм) и квазимонохроматического светодиодного ( $\lambda = 631$  нм,  $\Delta\lambda = 15$  нм,  $L_{\text{ког}} \sim 26$  мкм) источников, практически не отличаются. Переход же к широкополосному линейно поляризованному излучению ( $\lambda = 420\text{--}800$  нм с максимумами при  $\lambda = 453$  и  $567$  нм;  $\Delta\lambda = 130$  нм,  $L_{\text{ког}} < 2,5$  мкм) сопровождается снижением биологического действия. Например, при оптимальной дозовой нагрузке на эмбрионы ( $P = 2,9$  мВт/см<sup>2</sup>,  $t = 60$  с) величина фотобиологического эффекта, оцениваемого по показателям массы 50-дневных особей, составляет  $(120,4 \pm 2,9)$  % ( $P < 0,001$ ) при использовании лазерного излучения,  $(118,6 \pm 3,7)$  % ( $P < 0,001$ ) при использовании квазимонохроматического и  $(111,1 \pm 1,8)$  % ( $P < 0,001$ ) при воздействии широкополосного белого света. При этом следует отметить, что максимум спектра испускания белого светодиода ( $\lambda = 567$  нм) сдвинут в коротковолновую область по сравнению с красным светодиодом ( $\lambda = 631$  нм), что может быть одной из причин наблюдаемых различий в действии излучения указанных источников. Среди других возможных причин снижения фотобиологических эффектов при переходе от квазимонохроматического к широкополосному источнику выделяют наличие выраженного экранирующего действия со стороны меланина. Спектр электронного поглощения меланина характеризуется гладкой бесструктурной кривой, монотонно снижающейся по мере увеличения длины волны в диапазоне 300–800 нм. По этой причине слой меланина, покрывающий икру осетровых рыб, выступает в роли своеобразного оптического экрана, прежде всего для сине-зеленой составляющей спектра испускания широкополосного светодиодного источника, снижая интенсивность воз-

действующего излучения и его фотобиологическую активность. Ответ на данный вопрос может быть получен в ходе последующих исследований. Принципиальный вывод, который следует из представленных данных, состоит в том, что биологической активностью обладает как поляризованное монохроматическое лазерное излучение, так и поляризованный свет квазимонохроматического и широкополосного светодиодных источников, степень временной когерентности которых на 2–4 порядка ниже соответствующего значения лазерного излучения.

Хорошо известно, что при прохождении излучения через биологическую ткань наблюдается его быстрая деполяризация. Возникает естественный вопрос: каким образом в таком случае поляризация излучения может играть определяющую роль в реализации его биологического и терапевтического действия? В этой связи следует отметить, что, согласно литературным данным, свет красной и ближней инфракрасной областей спектра может распространяться в коже человека на глубину приблизительно 1,2 мм, сохраняя еще линейную поляризацию. Цельная кровь характеризуется длиной деполяризации, равной примерно 4,0 мм. По всей видимости, изменения, индуцируемые поляризованным излучением в объеме ткани (в которой еще сохраняется поляризация излучения), генерализуются на весь организм в целом.

По нашему мнению, совокупность полученных данных позволяет сделать вывод о том, что в основе фотофизического механизма, определяющего биологическое действие оптического излучения низкой интенсивности при его воздействии на эмбрионы, кроме диполь-дипольных взаимодействий лежит ориентационный эффект нефотохимической природы. Как известно, ориентационное действие света наиболее изучено на примере прозрачных нематических жидких кристаллов (НЖК), для которых было показано, что под действием непрерывного лазерного излучения видимой области спектра ( $W = 50$  мВт,  $P = 10^2 - 10^3$  Вт/см<sup>2</sup>) наблюдается переориентация их на десятки градусов. Такая переориентация НЖК получила название светоиндуцированного эффекта Фредерикса. Выбор НЖК для исследования ориентационного действия света не случаен: ориентационная оптическая нелинейность НЖК вследствие плотной упаковки одинаково ориентированных молекул в домене (способных ориентироваться лишь доменом) на 9 порядков превышает керровскую нелинейность обычных жидкостей. При этом ориентирующее влияние излучения на прозрачные НЖК сводится к прямому силовому действию электрического поля световой волны на индуцированные им молекулярные диполи. Ха-

рактарно, что основные закономерности, прослеживаемые при ориентационном действии излучения на НЖК (наличие эффекта для линейно или циркулярно поляризованного излучения; зависимость эффекта от амплитудного значения мощности излучения; инерционность процесса, требующая воздействия излучения в течение десятков секунд; повышение эффективности переориентации за счет воздействия двух физических факторов: лазерного излучения и постоянного магнитного поля), проявляются и при изучаемых нами фотобиологических процессах. При этом жидкокристаллическое состояние биологических структур (и прежде всего клеточных мембран) в настоящее время является общепризнанным и считается необходимым условием их функционирования. Согласно современным представлениям, биологическая мембрана характеризуется сильно неравномерным (неравновесным) распределением компонентов в липидном бислое: липид-липидные и белок-липидные кластеры, белок-липидные домены, образующие упорядоченные достаточно подвижные области из сотен молекул, в которых плотность упаковки существенно отличается от соседних частей. Характерной особенностью строения мембран является их структурная лабильность и наличие напряженных метастабильных состояний, способных к кооперативным структурным перестройкам под действием внешних сил различной природы. При этом процесс структурных перестроек в мембране не может не приводить к изменению функционирования клеток, включая изменение скорости их пролиферации. Имеются основания полагать, что даже относительно простые биохимические явления – последовательные цепи ферментативных реакций, осуществляемых по эстафетному механизму, могут протекать лишь в структурах (мультиферментных комплексах, образованных 10–15 олигомерными ферментами, состоящими из 2–8 полимерных субъединиц), принципы интеграции и самосборки которых такие же, как и в жидких кристаллах.

Как уже отмечалось, гипотеза об ориентационном действии излучения в отсутствие резонансного поглощения была выдвинута ранее для интерпретации данных, полученных при действии излучения на культивируемые клетки. Один из принципиальных моментов, важных для объяснения ориентационного нерезонансного механизма действия излучения (как и диполь-дипольных взаимодействий, а также градиентных сил), состоит в выяснении вопроса: откуда берется энергия на переориентацию жидких кристаллов в отсутствие поглощения? Согласно оценкам, указанная работа осуществляется за счет изменения

частоты ( $\Delta\nu$ ) света («покраснения квантов»), характеризующегося ничтожно малой величиной ( $\Delta\nu / \nu \sim 10^{-15}$ ).

Следует отметить, что в последние годы получены данные, свидетельствующие о том, что ориентационное действие света на НЖК (зависимое от типа поляризации излучения) проявляется и в случае наличия у них слабого примесного или собственного поглощения. Физические процессы, ответственные за переориентацию поглощающих НЖК, в полной мере не выяснены и являются предметом многочисленных исследований и дискуссий. Считается, что механизм светоиндуцированной переориентации поглощающих НЖК обусловлен изменением характера межмолекулярных взаимодействий при поглощении частью молекул световых квантов. Поскольку ориентационная нелинейность для поглощающих НЖК увеличивается на два порядка по сравнению с прозрачными и средняя мощность излучения, необходимая для эффективной переориентации, не превышает 1 мВт, то это делает наиболее вероятным проявление указанного механизма в реализации изучаемого биологического действия оптического излучения.

### 3. ТЕХНОЛОГИЯ ЗИМОВКИ РЕМОНТНО-МАТОЧНЫХ СТАД ОСЕТРОВЫХ

Важным условием нормального развития репродуктивной системы осетровых рыб является сезонность температурного режима содержания старших ремонтных групп. Выращивание ремонта в течение первых лет в теплой воде с круглогодичным кормлением позволяет ускорить созревание в 1,5–2,5 раза и существенно сократить продолжительность нерестовых интервалов (табл. 18). При этом для успешного завершения процесса гонадогенеза необходимо в определенном для каждого вида возрасте вводить в технологический цикл период содержания при низкой температуре – «зимовку» с обязательной пищевой депривацией.

Таблица 18. Возраст первого созревания и оптимальное время перевода на естественный температурный режим ремонта стерляди

Вид	Возраст первого созревания, лет		Возраст перевода ремонта на содержание при естественном температурном режиме, лет	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Стерлядь	2–3	3–5	2	2

Постоянно высокие температуры и кормление могут привести к ожирению осетровых рыб и значительной задержке их окончательного созревания. Даже при достижении самками осетровых рыб 4-й стадии зрелости гонад выходы икры (оосоматические индексы) могут быть очень низкими.

Оптимальный температурный режим содержания маточного стада стерляди представлен на рис. 118.

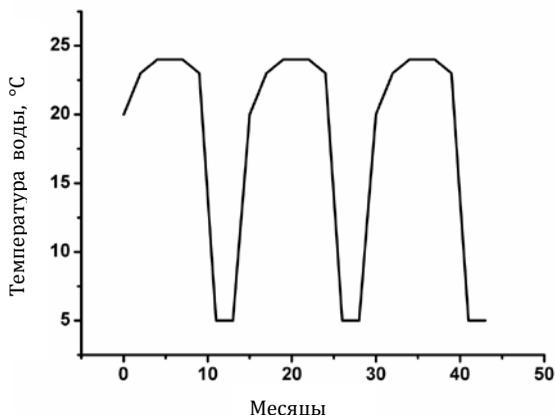


Рис. 118. Оптимальный температурный режим содержания ремонтно-маточного стада стерляди

Скорость генеративных процессов у осетровых зависит в первую очередь от температуры содержания. При расчете теплозапаса, выражающегося в градусо-днях, принимается во внимание только период, проведенный рыбой при так называемой эффективной температуре. Эффективной принято считать температуру от нерестового оптимума до минимальной температуры воды, при которой рыба перестает питаться.

При формировании маточных стад осетровых для каждого разводимого вида следует принимать во внимание значение двух показателей:

- теплозапас, необходимый для достижения половой зрелости;
- теплозапас, необходимый для прохождения одного цикла гаметогенеза (табл. 19).

Таблица 19. Сумма эффективных температур, обеспечивающих первое и последующие созревания самок стерляди

Вид	Теплозапас, необходимый для первого созревания, град-дн.		Продолжительность межнерестовых интервалов (самки), град-дн.
	Самцы	Самки	
Стерлядь	6 000–9 000	12 000–13 000	2 800–4 200

Хотя общий теплозапас и является достаточно универсальным показателем, это не единственный фактор, определяющий возраст полового созревания и продолжительность межнерестовых интервалов.

При превышении плотностей посадок, слишком малом или избыточном рационе, несоблюдении рекомендаций по проведению «зимовки» созревание производителей может сильно затянуться и сопровождаться значительными нарушениями гонадогенеза. Восстановление репродуктивных качеств таких рыб или окажется невозможным, или потребует применения длительной и сложной терапии.

Технология формирования продукционных стад осетровых с применением установок замкнутого водоснабжения предусматривает проведение искусственной зимовки – содержания производителей в течение определенного времени в бассейнах с прямоточной системой водоподдачи и пониженной температурой воды.

«Зимовка» является необходимым этапом технологического процесса, так как важным условием нормального развития репродуктивной системы осетровых рыб является сезонность температурного режима. Для незрелых и потенциальных самок, так же как и для зрелых, начиная с 5-го года выращивания (после осенней бонитировки) в технологический цикл вводится период «зимовки».

Для чего нужна искусственная зимовка производителям:

1. В условиях искусственной зимовки, максимально приближенных к естественным, у самок происходит дозревание ооцитов.
2. За время выращивания в УЗВ генеративная ткань самок приобретает запах и вкус, не свойственные икре, зимовка способствует уменьшению данных негативных факторов.
3. У самцов завершается процесс сперматогенеза.

Известно, что процесс «зимовки» осетровых рыб разного возраста в неадекватных условиях существенно влияет на их выживаемость и функциональное состояние. Это нередко приводит к повышенной потере массы тела рыб, а в отдельных случаях даже к сверхнормативной элиминации. Поэтому в период «зимовки» очень важно следить не

только за параметрами водной среды, но и за качеством нагула рыбы перед «зимовкой», и за физиологической готовностью рыбы к «зимовке».

Результаты «зимовки» во многом зависят от физиологического состояния осетровых рыб и абиотических факторов среды обитания.

Сигналом к началу перехода на «зимовку» служит снижение температуры воды и, как следствие, почти полное прекращение потребления корма осетровыми.

Для успешной «зимовки» очень важны упитанность и масса рыб, поэтому необходимо кормление осетровых, особенно в конце периода выращивания, кормами с повышенным содержанием жира, так как именно в этот период в организме рыб создаются запасы резервных питательных веществ.

Рекомендуется также проводить инъекцирование рыб витаминами С и Е перед «зимовкой».

При выращивании осетровых с понижением температуры воды до 12 °С обычно прекращают проводить кормление рыбы. Негативной стороной при этом является значительная потеря массы за «зимовку», ухудшение физиологического состояния рыбы, длительный период ремиссии при возобновлении кормления и, как следствие, удлинение сроков выращивания.

Искусственная зимовка – содержание рыб при низкой (2–6 °С) температуре в течение 2–3 мес. Данный элемент биотехники является обязательным при работе со всеми производителями осетровых, как с отловленными в естественных водоемах в период осенней заготовки, так и с рыбами из маточного стада. Зарыбление зимовальных водоемов проводят при среднесуточной температуре воды не выше 8 °С. Оптимальный температурный интервал содержания рыб во время «зимовки» составляет 4–5 °С. При этом допускаются кратковременное повышение температуры до 7 °С и ее понижение до 3 °С. Длительное пребывание рыбы за границами указанного оптимального интервала температур приводит к ухудшению ее физиологического состояния и, как следствие, к снижению качества половых продуктов (рис. 119).

Оптимальным режимом перевода самок в состояние искусственной зимовки является понижение температуры с градиентом 1–2 °С в сутки (рис. 120). Выращивание рыбы в системе УЗВ происходит при средней температуре 23 °С. В течение 12–13 сут зрелые самки переходят в режим искусственной зимовки с температурой воды 4–5 °С. При низких температурах самки малоподвижны, кормление их не производится.

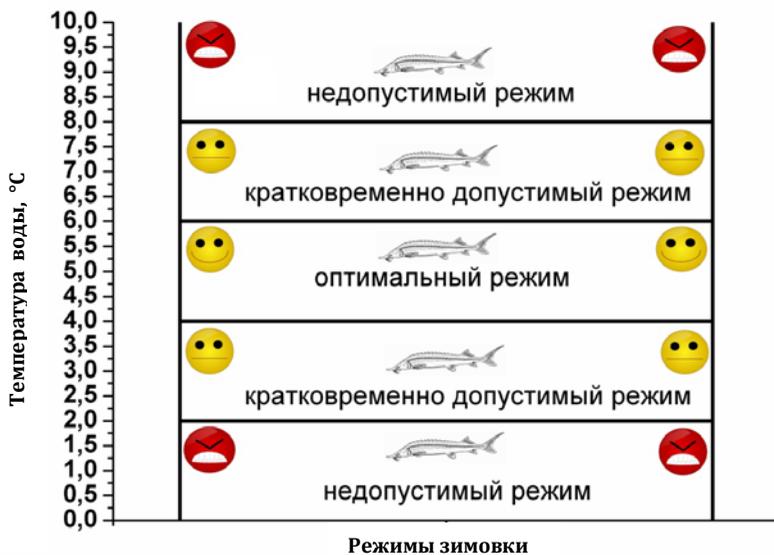


Рис. 119. Температурные режимы зимовки осетровых рыб

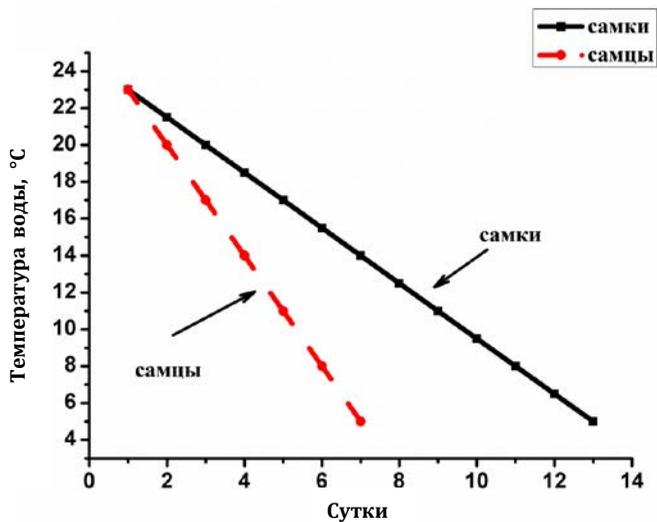


Рис. 120. Рекомендуемый график перевода производителей в режим «зимовки»

Нежелательны различного рода прикосновения к рыбе, так как при низких температурах поврежденный слой слизи и кожный покров длительное время не восстанавливаются, что может привести к заболеванию и гибели рыбы. Продолжительность искусственной зимовки не менее 60 сут или не менее 300 град-дн.

В зимовальных бассейнах необходимо поддерживать постоянный расход воды, обеспечивающий 80–100 % насыщения воды кислородом. Содержание кислорода менее чем 60 % насыщения недопустимо.

Перед пересадкой в зимовальные бассейны целесообразно провести профилактическую обработку рыб (ванны с соевым раствором или раствором метиленового синего), а также обработку самих бассейнов перед запуском системы.

В течение всего периода «зимовки» в системе необходимо поддерживать оптимальные водообмен и проточность, постоянно осуществлять контроль за санитарным (накопление взвесей и пр.) и гидрохимическим (содержание кислорода, окислов железа, аммиака, окисляемость, pH) режимами (табл. 20). Также, по возможности, необходимо контролировать состояние и поведение рыб. Кормление производителей осетровых рыб в период «зимовки» не производится, что является важным условием эффективного завершения созревания гонад.

Таблица 20. Требования к параметрам качества воды, поступающей в зимовальную систему

Температура, °С	Температура воды не должна повышаться более чем на 5° для форелевых прудов и на 8° для карповых прудов
Взвешенные вещества, г/м <sup>3</sup>	До 10,0
Водородный показатель (pH), ед.	6,5–8,0
Кислород растворенный, г/м <sup>3</sup>	Более 6,0
Диоксид углерода растворенный, г/м <sup>3</sup>	Не более 15,0
Окисляемость перманганатная, г O <sub>2</sub> /м <sup>3</sup>	До 10,0
БПК <sub>5</sub> , г O <sub>2</sub> /м <sup>3</sup>	Не более 3,0
БПК <sub>полн.</sub> , г O <sub>2</sub> /м <sup>3</sup>	Не более 4,5
Азот аммонийный (аммоний-ион), г N/м <sup>3</sup>	До 1,0
Нитриты (нитрит-ион), г N/м <sup>3</sup>	Тысячные доли
Сероводород растворенный, г/м <sup>3</sup>	Отсутствие
Железо общее, г/м <sup>3</sup>	Не более 0,3
Железо закисное, г/м <sup>3</sup>	Не более 0,05

Во время «зимовки» регулярно проводится осмотр рыбы. При обнаружении у рыб покраснений и потертостей различных областей тела, плавников, жучек поврежденные места обрабатывают 5%-ным раствором перманганата калия и перекисью водорода.

В период искусственной зимовки самцы и самки содержатся отдельно. Допускается совместное содержание зрелых самцов и самок с обязательным разделением до начала подъема температур.

При получении половых продуктов в осенне-зимний период и ранней весной (до начала основного нерестового сезона) перевод на зимовальный режим и вывод из него производится искусственно.

При этом следует придерживаться следующих рекомендаций:

- перевод в режим зимовальных температур должен производиться постепенно, с температурным градиентом 1–2 °С в сутки для самок и 2–3 °С для самцов;

- рыб с поврежденными кожными покровами следует содержать при температуре 8–10 °С до полного выздоровления и только после этого понижать температуру;

- перевод в нерестовый режим должен быть постепенным: с суточным градиентом при повышении температуры не более 1,5 °С для самок и 2–3 °С для самцов, с периодами содержания при постоянной температуре.

Во время бонитировки самок, гонады которых не достигли за период зимовки 4-й стадии зрелости, а также самок с резорбцией ооцитов отбраковывают и отсаживают на нагул.

Выход рыбы, не достигшей половой зрелости, из «зимовки» происходит путем повышения температуры воды с шагом 2 °С в сутки до температуры содержания рыбы в системе. Процедура вывода рыбы в режим выращивания занимает не более 10 сут. Кормление рыбы рекомендуется начинать при температуре 8–10 °С, при этом суточная норма кормления снижена в два раза. В среднем около 50 сут самки содержатся без кормления. Потеря биомассы за «зимовку» не превышает 5–10 %.

#### **4. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРОВЕДЕНИЮ МОНИТОРИНГА ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ОСЕТРОВЫХ РЫБ В ПЕРИОД ИНКУБАЦИИ**

Эмбриональное развитие осетровых рыб включает в себя два периода – период икринки (от оплодотворения до выклева) и период свободного эмбриона (от выклева до перехода на внешнее питание).

Период икринки состоит из пяти этапов, которые включают в себя 36 стадий развития.

В эмбриональном развитии существуют критические стадии, во время которых эмбрионы чувствительны к любым внешним факторам (сильные механические воздействия, изменение режима инкубации, температуры, кислорода, обработка лечебными препаратами) и могут массово гибнуть.

На рис. 121–125 представлены основные стадии каждого этапа периода икринки, включая критические. (Изображения справа инвертированы для удобства рассмотрения стадий развития.)

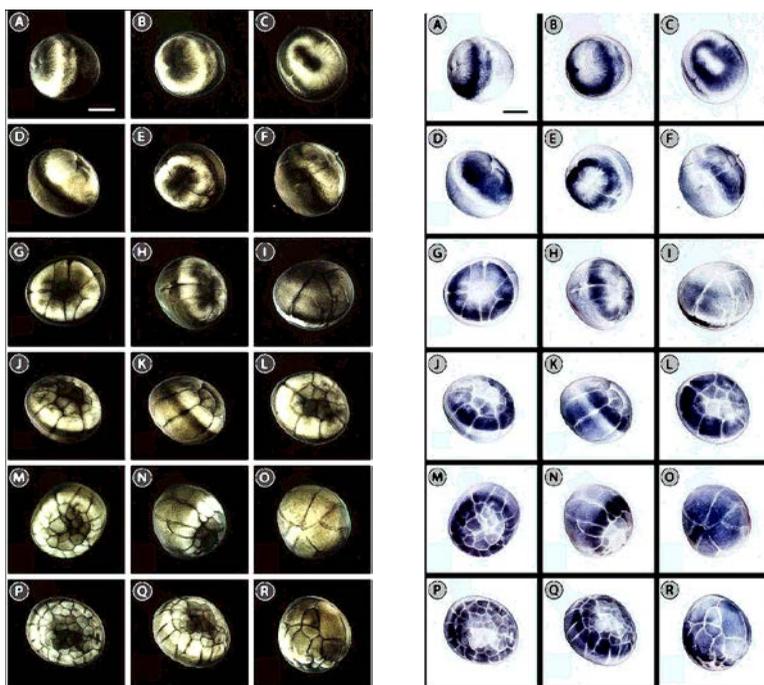


Рис. 121. Эмбриональное развитие осетровых рыб – период икринки (этапы 0–1).

Этап 0 – оплодотворение (стадии 1–3): стадия 1 – оплодотворенного яйца после поворота и образования перивителлинового пространства (А); стадия 3 – светлого серпа (В). Этап 1 – дробление (стадии 4–12, С – R).

Критическая стадия: 4-я – появление борозды первого деления (С)

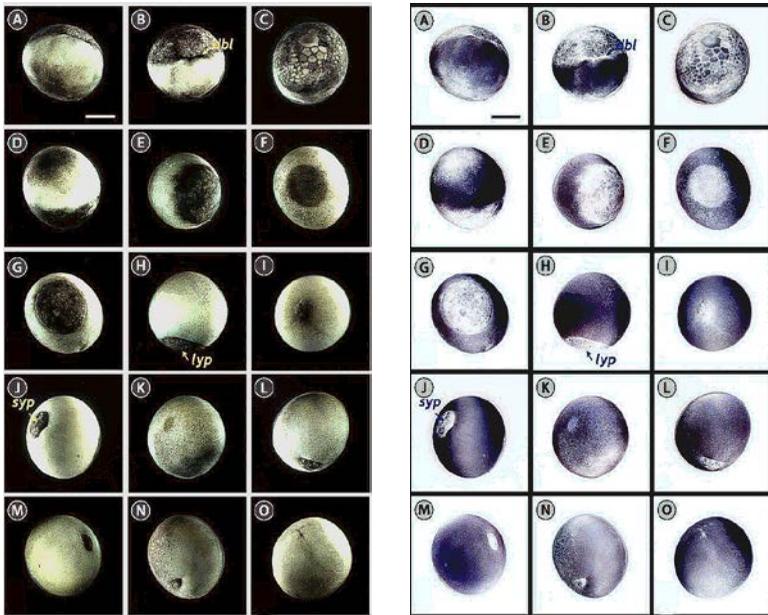


Рис. 122. Эмбриональное развитие осетровых рыб – период икринки.

Этап 2 – гастрюляция (стадии 13–18, А – О).

Критические стадии: 13-я – стадия начала гастрюляции (А);

18-я – стадия щелевидного бластопора (N, O)

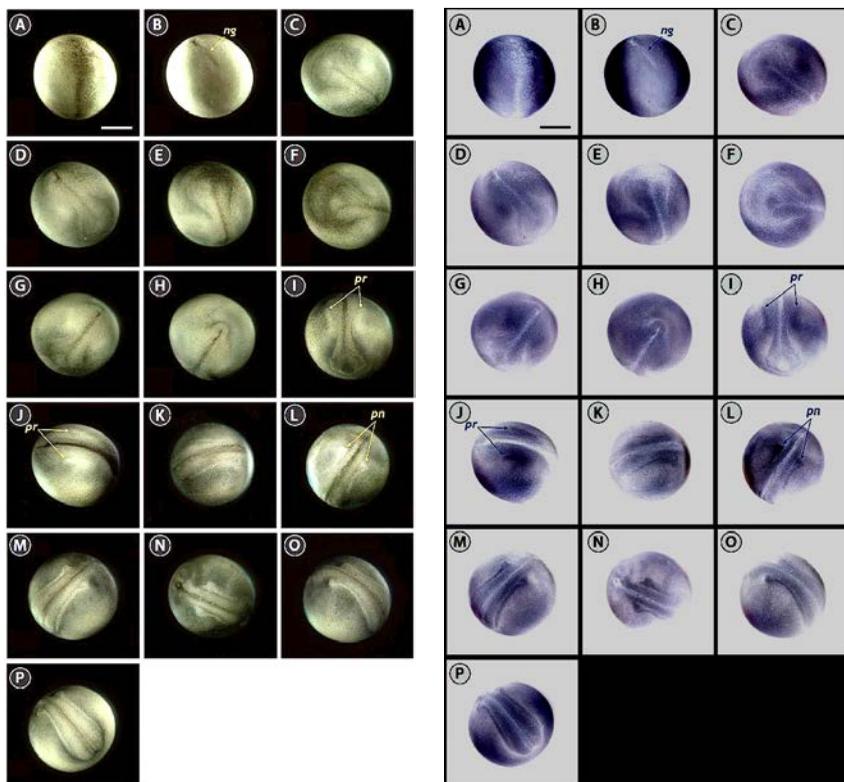


Рис. 123. Эмбриональное развитие осетровых рыб – период икринки.  
 Этап 3 – развитие зародыша от конца гаструляции до начала пульсации сердца:  
 А – нейруляция (стадии 19–23, А – I); Б – развитие зародыша от смыкания нервных валиков до начала пульсации сердца (стадии 24–28).  
 Критические стадии: 23-я – стадия замкнувшейся нервной трубки (I);  
 26-я – стадия слияния боковых пластинок и начала обособления хвостового отдела зародыша (М – Р)

Примечание. Из этапа 3Б на рисунке представлены стадии 24–26 (J – P).

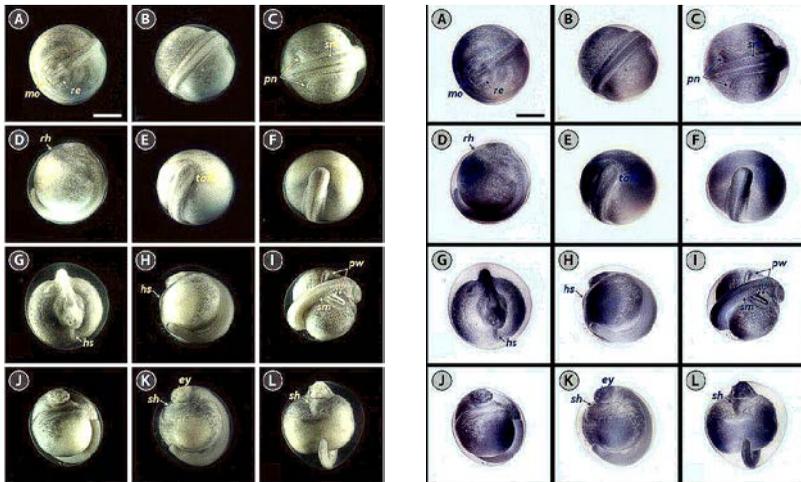


Рис. 124. Эмбриональное развитие осетровых рыб – период икринки (этапы 3–4).  
 Этап 3 – развитие зародыша от конца гастрюляции до начала пульсации сердца: Б – развитие зародыша от смыкания нервных валиков до начала пульсации сердца (стадии 24–28).  
 Этап 4 – развитие зародыша от начала пульсации сердца до освобождения из оболочек (стадии 29–36). Критическая стадия: стадия образования S-образного изгиба сердца

Примечания: 1. Из этапа 3Б на рисунке представлены стадии 27–28 (А – F).  
 2. Из этапа 4 на рисунке представлена стадия 29 (G – L).

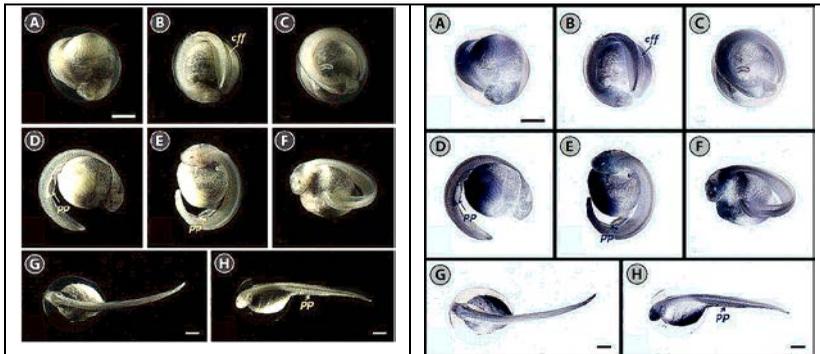


Рис. 125. Эмбриональное развитие осетровых рыб – период икринки. Этап 4 – развитие зародыша от начала пульсации сердца до освобождения из оболочек (стадии 29–36).  
 Критическая стадия: 32-я – стадия, на которой конец хвоста касается головы (С)

Примечание. Из этапа 4 на рисунке представлены стадии 30–36 (А – H).

Таким образом, *в периоде икринки* выделяют следующие *критические стадии развития*:

- 4-я – появление борозды первого деления;
- 13-я – стадия начала гастрюляции;
- 18-я – стадия щелевидного бластопора;
- 23-я – стадия замкнувшейся нервной трубки;
- 26-я – стадия слияния боковых пластинок и начала обособления хвостового отдела зародыша;
- 29-я – стадия образования S-образного изгиба сердца;
- 32-я – стадия, на которой конец хвоста касается головы.

Ниже представлены графики наступления критических стадий развития периода свободноембриона в зависимости от температуры (рис. 126–128).

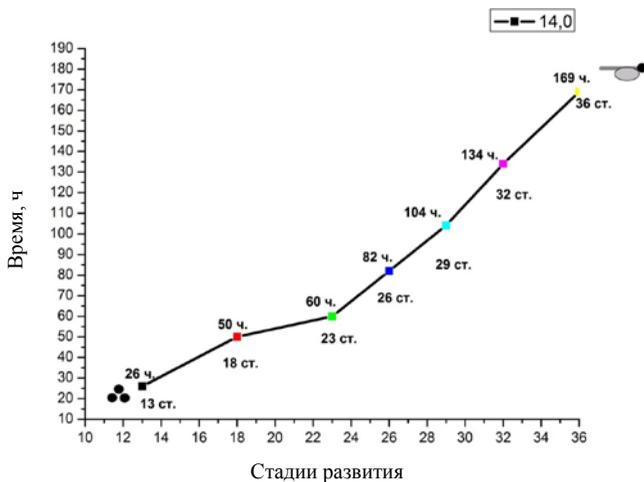


Рис. 126. Время наступления критических стадий развития при температуре 14,0 °C

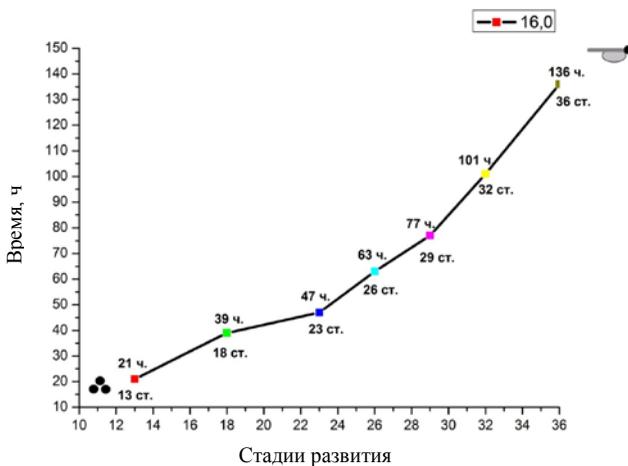


Рис. 127. Время наступления критических стадий развития при температуре 16,0 °С

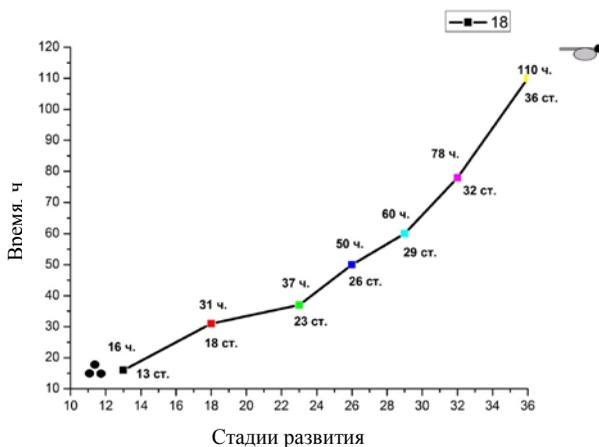


Рис. 128. Время наступления критических стадий развития при температуре 18,0 °С

В периоде свободного эмбриона выделяют две критические стадии: 40-я – стадия перехода на жаберное дыхание; 45-я – стадия перехода на внешнее питание. На рис. 129 приведены стадии развития свободного эмбриона зеленого и белого осетра, а также время их наступления при температуре 18,0 °С (рис. 130).



Рис. 129. Стадии развития свободного эмбриона зеленого и белого осетра

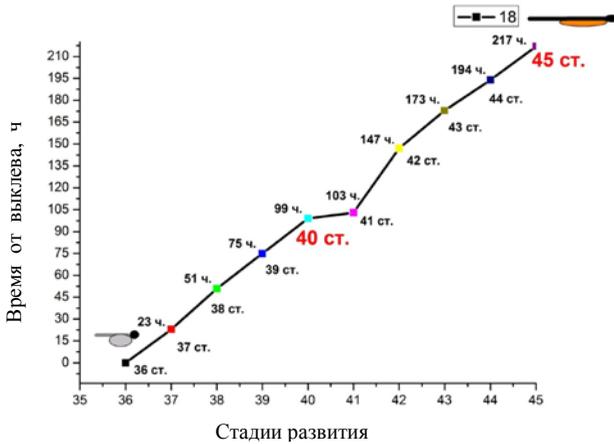


Рис. 130. Время наступления критических стадий развития свободного эмбриона при температуре 18,0 °C

***Источниками отхода осетровых рыб за период инкубации могут быть:***

- 1) гибель слабой икры на ранних стадиях развития;
- 2) гибель неоплодотворившихся яиц;
- 3) гибель уродливых зародышей;
- 4) гибель вследствие неблагоприятных внешних условий в период инкубации.

***Мониторинг эмбрионального развития.***

В целях изучения эффективности проведения воспроизводственных мероприятий осуществляют мониторинг эмбрионального развития по следующим критериям:

- масса одной икринки;
- количество икринок в 1 г;
- диаметр икринок;
- процент оплодотворения (определяется на стадии «появление борозды первого деления»);
- процент неактивированных яиц;
- процент партеногенетически развивающихся икринок;
- процент погибшей икры на ключевых стадиях развития;
- процент поражения сапролегниозом;
- время наступления ключевых стадий;
- синхронизация выклева (время от начала первого выклева до стадии завершения массового выклева);
- процент выклева от посаженных на инкубацию предличинок;
- процент уродливо развивающихся предличинок;
- масса и длина однодневных предличинок;
- показатель деформации желточного мешка предличинок – норма 0,55–0,69 (схема измерения приведена на рис. 131);
- синхронизация выброса меланиновых пробок (начало первого выброса – завершение массового выброса);
- время перехода на активное питание;
- масса и длина личинок;
- процент перехода на активное питание;
- процент уродливо развивающихся личинок;
- гидрохимический контроль на всех этапах эмбрионального развития.

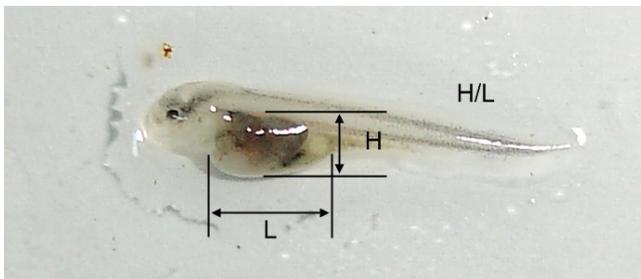


Рис. 131. Схема измерения деформации желточного мешка

**Подсчет процента оплодотворения.** Для оценки рыбоводного качества инкубируемой икры подсчитывают соотношение развивающихся и мертвых икринок. Икра хорошего качества имеет чистые прозрачные оболочки, позволяющие отчетливо наблюдать за ходом эмбриогенеза. Мертвая икра заметно увеличивается в размере, в отличие от нормально развивающихся эмбрионов, и имеет характерную «мраморную» или белую мутную окраску. Первоначальный процент оплодотворения икры подсчитывается на стадии второго-третьего деления, или дробления (4–8 бластомеров) (рис. 132). Время отбора проб для определения процента оплодотворения яиц зависит от температуры воды. Соответствующий график представлен на рис. 133. Для подсчета процента оплодотворения икру в аппарате перемешивают, берут пробу 100–200 икринок, просматривают невооруженным взглядом или с помощью бинокля, отделяют мертвые, неоплодотворенные активированные, полиспермные икринки, а затем подсчитывают долю нормально развивающихся эмбрионов в общем количестве икринок в пробе.

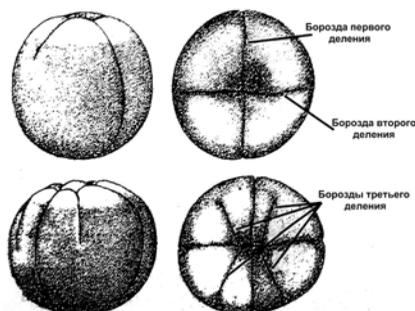


Рис. 132. Стадия второго-третьего деления (4–8 бластомеров)

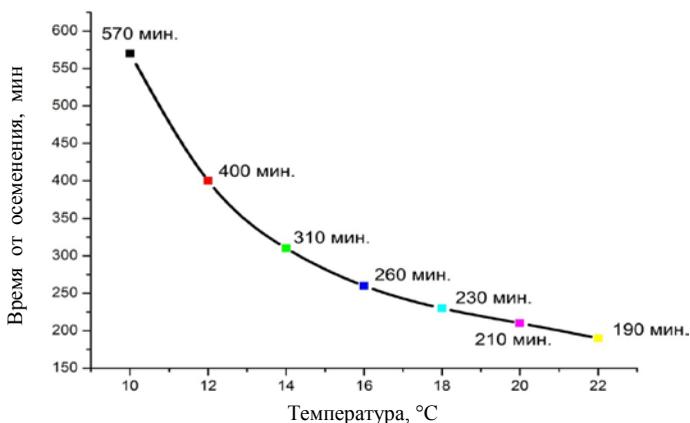


Рис. 133. Зависимость времени наступления стадии второго-третьего деления (4–8 бластомеров) от температуры

## 5. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРОВЕДЕНИЮ КОМПЬЮТЕРНОГО АНАЛИЗА КАЧЕСТВА СПЕРМАТОЗОИДОВ ОСЕТРОВЫХ РЫБ

Основная функция сперматозоида состоит в активации яйца, побуждении его к развитию, а также в снабжении гаплоидным ядром. В связи с этим подвижность сперматозоидов является одним из важных параметров. Основная роль в снабжении сперматозоида энергией принадлежит митохондриям, которые у рыб сконцентрированы в средней части сперматозоида. С функциональной точки зрения подвижность сперматозоидов напрямую зависит от уровня АТФ поэтому способность влияния на уровень АТФ может существенно изменить подвижность сперматозоидов. Сперматозоиды являются популярным биологическим объектом для оценки влияния факторов физической и химической природы на качество половых продуктов самцов. Так, увеличение срока хранения спермы индейки наблюдалось при добавлении витаминов Е и С, а введение цианокобаламина в криозащитную среду на начальных этапах криоконсервации спермы русского осетра повышало выживаемость и время движения сперматозоидов. Воздействие на сперму человека рентгеновским излучением угнетало, ультрафиолетовым не влияло, а инфракрасным излучением и электромагнитным полем повышало подвижность сперматозоидов. Воздействие гамма-

излучением на сперматозоиды крысы оказывало негативное влияние, а воздействие лазерным излучением красной области спектра повышало качество спермы индейки и собаки. Кроме того, воздействие на сперму тилапии светом белой, а также красной областей спектра приводило к повышению подвижности сперматозоидов. Воздействие светом синей и ультрафиолетовой областей спектра оказывало отрицательный результат.

В ветеринарии и животноводстве много лет известны следующие методы оценки качества спермы животных: изучение анатомического строения сперматозоидов, объема эякулята, цвета, запаха, консистенции; оценка подвижности, густоты, интенсивности дыхания, резистентности, скорости обесцвечивания и др.

В животноводстве оценку спермы по подвижности проводят по десятибалльной системе. Наивысшую оценку – 10 баллов дают сперме в том случае, если все спермии обладают поступательным движением; при оценке в 9 баллов – 9 спермиев из 10 обладают прямолинейно-поступательным движением, 6 баллов – 6 из 10 и т. д. В рыбоводстве активность сперматозоидов выражают в баллах по шкале Персова, в которой за 5 баллов принимается быстрое поступательное движение всех спермиев; 4 балла – большинства спермиев, но в поле зрения встречаются отдельные сперматозоиды, осуществляющие замедленное зигзагообразное, круговое или колебательное движение; 3 балла – части спермиев, причем преобладает замедленное зигзагообразное, круговое или колебательное движение, имеются неподвижные спермии; 2 балла – быстрое поступательное движение наблюдается редко, у части спермиев колебательное движение, около 75 % спермиев неподвижны; 1 балл – все спермии неподвижны.

**Густота спермы**, определяемая при глазомерной микроскопической оценке, дает приблизительное представление о количестве спермиев в 1 мл эякулята. **Резистентность спермы** выражается количеством миллилитров 1%-ного раствора хлористого натрия, которое нужно добавить к 1 мл спермы, чтобы в ней прекратилось поступательное движение спермиев. **Активность спермы** оценивают по скорости обесцвечивания (восстановления) метиленовой синьки, смешанной со спермой. **Подсчет сперматозоидов** позволяет оценить число сперматозоидов с приемлемой изменчивостью из-за разбавления и подсчета ошибок до 6 % на 300 сперматозоидов при наблюдении, когда подсчет 1:500 разбавленной спермы повторяется 3 раза.

Все вышеперечисленные методы являются достаточно субъективными, с большим процентом ошибок, который в значительной степени зависит от человеческого фактора.

С развитием высокоскоростной съемки и компьютерных технологий стали возможны исследования движения одновременно нескольких клеток с определением траектории их перемещения и скорости. Использование аппаратно-программных комплексов для определения концентрации, характеристики движения сперматозоидов, а также морфологических критериев клеток легло в основу новой технологии в лабораторной медицине – CASA (computer-assisted semen analysis) – компьютерного анализа подвижности сперматозоидов. CASA позволяет проводить оценку таких показателей подвижности, как криволинейная скорость, прямолинейная скорость, линейность. Совокупное использование полученных данных позволяет дать объективную оценку качеству спермы и преодолеть субъективность интерпретации, присущей стандартной спермограмме. Основное преимущество компьютерного анализа – это достоверное определение. В зависимости от количества одновременно находящихся в поле наблюдения сперматозоидов компьютер рассчитывает параметры движения либо всех, либо большей их части, что невозможно при ручном производстве спермограммы. Другим важным преимуществом является воспроизводимость, т. е. результат исследования не зависит от лаборанта, производящего исследование, от уровня его подготовки, степени концентрации внимания или усталости. Можно быть уверенным, что проведенный одному пациенту анализ подвижности в разное время будет правильно отражать изменения показателей, исключая погрешности преаналитической стадии. Следующее преимущество – объективность: анализатор измеряет истинные скорости движения сперматозоидов, позволяя объективно судить о фертильности спермы. Совершенствование компьютерной морфологической диагностики позволяет получить принципиально новую количественную информацию, недоступную врачу при обычном визуальном анализе изображений под микроскопом.

Простота получения, относительная доступность и массовость сперматозоидов животных и рыб делают их популярными объектами в биологических, ветеринарных и сельскохозяйственных исследованиях при изучении механизмов искусственного оплодотворения. Применение компьютерного анализа при исследовании качества спермы животных и рыб позволяет стандартизировать методику таких исследований и ми-

минимизировать субъективизм и человеческий фактор в процессе получения новых научных результатов.

В большинстве случаев сперма, получаемая у рыб в условиях технологии искусственного воспроизводства, находится в неподвижном состоянии. Однако при добавлении обычной воды, в которой осуществляется выращивание и содержание рыб, сперматозоиды приобретают подвижность. Поэтому очень важно, в целях недопущения преждевременной активации, в процессе получения половых продуктов у самцов рыб тщательно вытирать полотенцем или марлевой салфеткой анальный и хвостовой плавники, а также место у анального отверстия. При этом необходимо следить, чтобы в пробирку не попали вода, полостная жидкость или экскременты рыбы. Сперматозоиды ленского осетра перед активацией водой представлены на рис. 134.

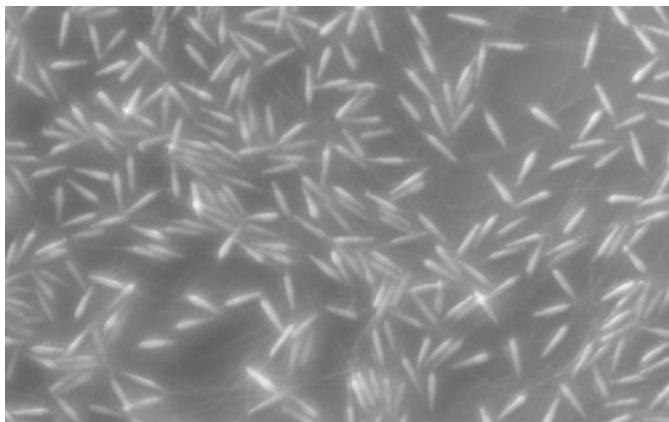


Рис. 134. Сперматозоиды ленского осетра перед активацией

Подвижность сперматозоидов исследуют на тринокулярном (тип Зидентофа) биологическом микроскопе проходящего света серии ММС-KZ-900 с независимой планахроматической оптической системой на бесконечность  $F = 200$  мм. Для анализа подвижности используют счетные камеры с фиксированной глубиной марки Leja. Запись подвижности сперматозоидов осуществляют с помощью видеокамеры ММС-31С12-М, построенной на основе сенсора компании Artina. Частота кадров в секунду – 12 при разрешении 2048×1536, 60 – при 800×600, 95 – при 640×480, 135 – при 512×384. Для исследований ка-

чества спермы используют автоматизированное программное обеспечение MMC Сперм, которое представляло собой основу для компьютерного спермоанализатора (CASA). Оценка концентрации сперматозоидов и анализ их подвижности производятся на видеоклипах в формате AVI (захваченных в память компьютера или записанных на жесткий диск) на основе алгоритма анализа с учетом требований руководства Всемирной организации здравоохранения.

В качестве анализируемых параметров используют следующие показатели, получившее распространение при исследовании подвижности сперматозоидов человека в медицинских исследованиях: VCL – криволинейная скорость, мкм/с (усредненная по времени скорость движения сперматозоида вдоль его реальной траектории, как она воспринимается в двухмерном пространстве под микроскопом); VSL – прямолинейная скорость, мкм/с (усредненная по времени скорость движения сперматозоида вдоль линии, проведенной между начальной и конечной точками траектории); VAP – средняя скорость движения по траектории, мкм/с (усредненная по времени скорость движения сперматозоида по усредненной траектории); WOB – колебание (величина, описывающая колебание реальной траектории относительно усредненной,  $WOB = VAP / VCL$ ); LIN – линейность (линейность реальной траектории).

Для исследования подвижности сперматозоидов пробу разбавляют активирующей средой в соотношении 1:50. Состав активирующей среды: 10 мМ NaCl, 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 10 мМ трис-HCl, pH 8,5. Для исследований допускаются образцы, подвижность которых превышала 90 %. Для предотвращения прилипания сперматозоидов предметные стекла обрабатываются 1%-ным сывороточным альбумином. В каждом видеоклипе оцениваются от 20 до 70 сперматозоидов. Сперматозоиды со скоростью менее 3 мкм/с считают неподвижными и исключают из расчета подвижности. По результатам полученных данных определяют величину стимулирующего действия физических факторов на показатели подвижности сперматозоидов.

Схема траекторий подвижности сперматозоидов представлена на рис. 135.

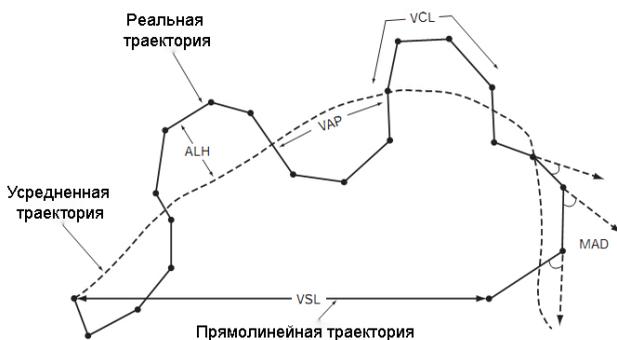


Рис. 135. Показатели подвижности сперматозоидов ленского осетра

Результаты апробации метода оценки подвижности сперматозоидов осетровых рыб в условиях аквакультуры с использованием современных методов компьютерной диагностики представлены в табл. 21. В результате наших исследований было установлено, что средняя криволинейная скорость сперматозоидов (VCL) ленского осетра составила  $(173,37 \pm 1,59)$  мкм/с, средняя прямолинейная скорость (VSL) –  $(164,19 \pm 1,82)$  мкм/с, а средняя скорость движения по траектории (VAP) –  $(171,22 \pm 1,20)$  мкм/с. Такой подробный анализ подвижности, в случае необходимости оценки массового количества сперматозоидов от племенных производителей рыб, позволяет формировать сперму по категориям подвижности, выделяя пробы с быстрым и прямолинейным движением, с медленным прямолинейным движением, с непрямолинейным движением и пробы с полностью неподвижными сперматозоидами. При этом появляется возможность выявлять умершие или умирающие «от старости» сперматозоиды на фоне здоровых, «молодых» сперматозоидов.

Таблица 21. Результаты измерений подвижности сперматозоидов осетровых рыб с использованием автоматизированного программного обеспечения ММС Сперм

Показатель подвижности	Среднее значение	Коэффициент вариации, %	Среднее квадратичное отклонение
VCL, мкм/с	$173,37 \pm 1,59$	2,9	5,05
VSL, мкм/с	$164,19 \pm 1,82$	3,5	5,76
VAP, мкм/с	$171,22 \pm 1,20$	2,2	3,81
WOB	$0,99 \pm 0,01$	2,7	0,02
LIN	$0,95 \pm 0,01$	3,5	0,03
STR	$0,96 \pm 0,10$	3,2	0,31

В наших исследованиях мы также определяли продолжительность подвижности сперматозоидов и зависимость средней криволинейной скорости от времени после активации водой (рис. 136).

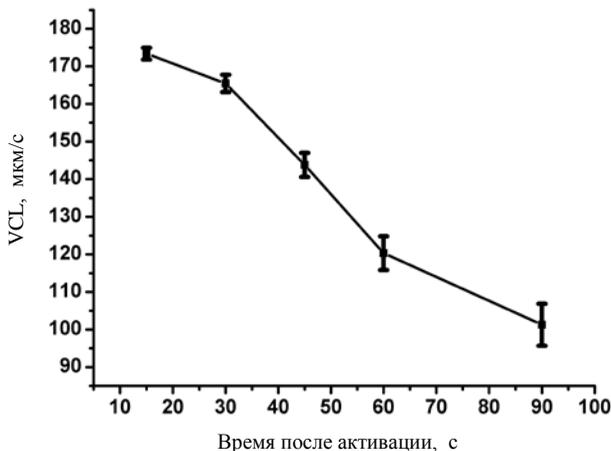


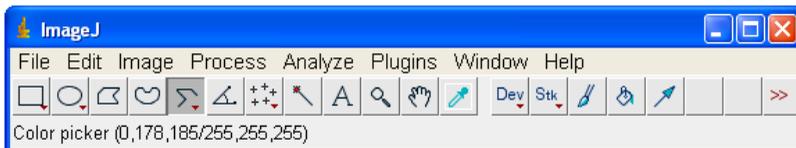
Рис. 136. Зависимость VCL от времени после активации водой

Как видно из данных, представленных на рис. 136, максимальные показатели средней криволинейной скорости у ленского осетра наблюдаются в первые 30 с после активации водой. Данный показатель стремительно падает уже к 90 с после активации. После 90 с в наших исследованиях наблюдалось значительное уменьшение показателя VCL, а затем полное прекращение подвижности. Аналогичная зависимость от времени после активации наблюдалась при изучении показателя процента (доли) подвижных сперматозоидов. Поэтому в процессе искусственного оплодотворения икры ленского осетра (и в целом осетровых) очень важно соблюдать четкую последовательную технологическую цепочку и не допускать медлительности в действиях, начиная с момента запуска (разбавления спермы) до момента добавления осеменяющего раствора к икре. Наши результаты показывают, что длительное осеменение икры (более 90 с) нецелесообразно, так как возможность успешного оплодотворения икры резко снижается. Учитывая высокую клеящую способность икры, которая наступает уже через 3–5 мин после оплодотворения, передержка икры в осеменяющем растворе опасна в связи с тем, что может вызвать

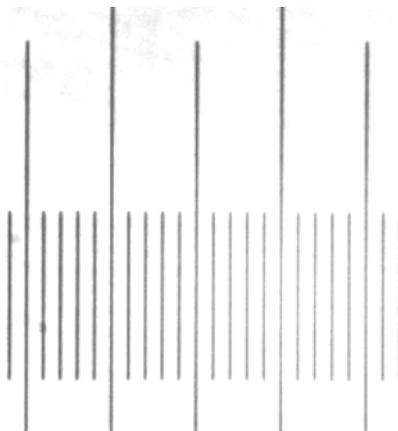
преждевременное приклеивание икры к поверхности осеменяющей емкости.

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**:

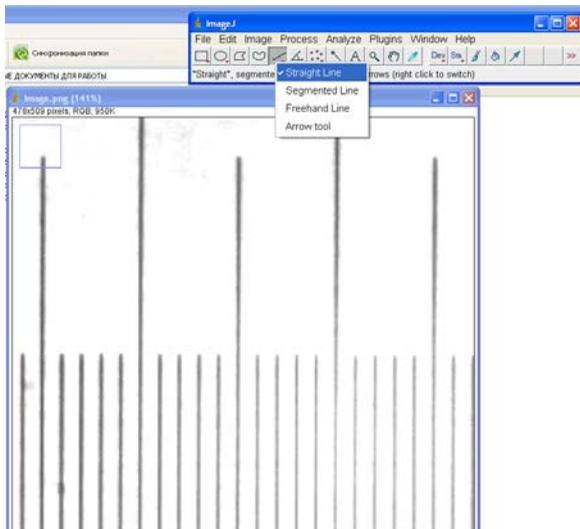


File / Open – открываем рисунок со специальной калибровочной шкалой для микроскопов, которая заранее фотографируется камерой микроскопа с использованием рабочего увеличения записи видеороликов.

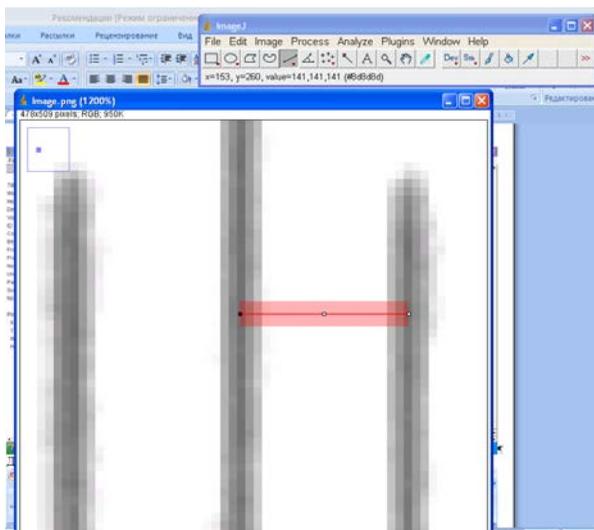


Снимок калибровочной шкалы важно делать в разрешении, одинаковом с разрешением видеоролика подвижности сперматозоидов.

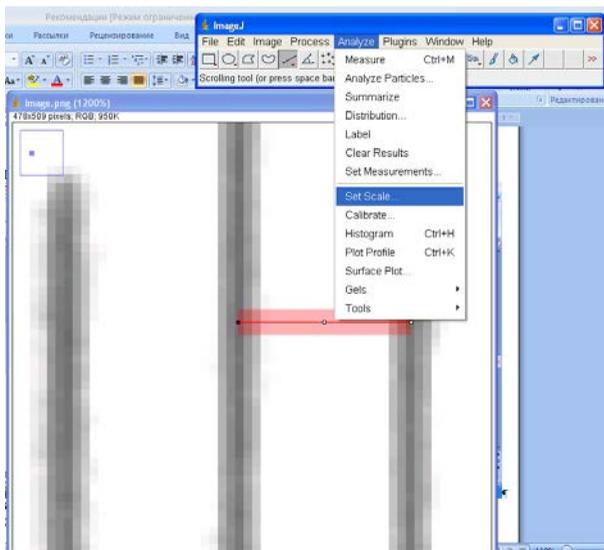
Далее выбираем инструмент *Straight Line*.



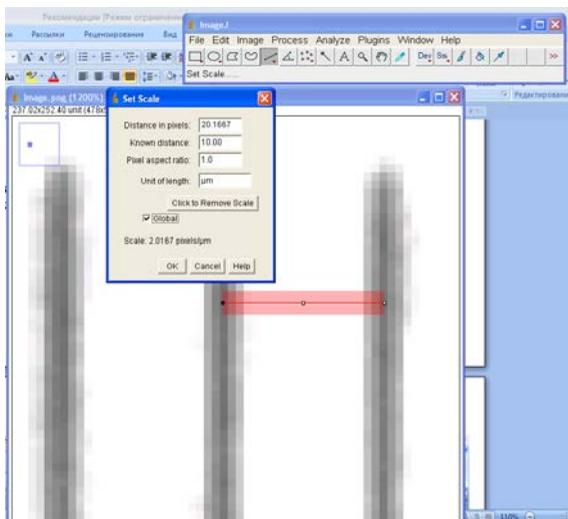
Измеряем шкалу деления в длину. Для точности измерений рисунок увеличиваем.



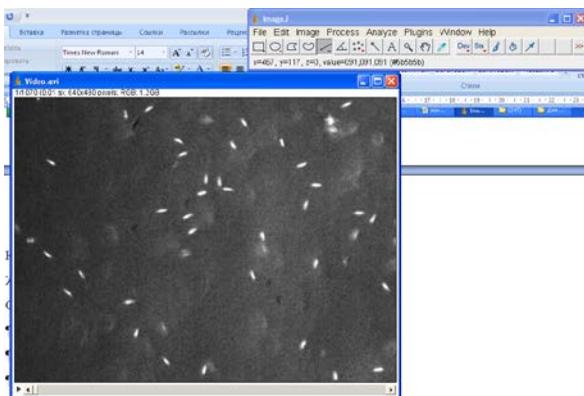
Далее данную длину необходимо откалибровать. Выбираем следующее:



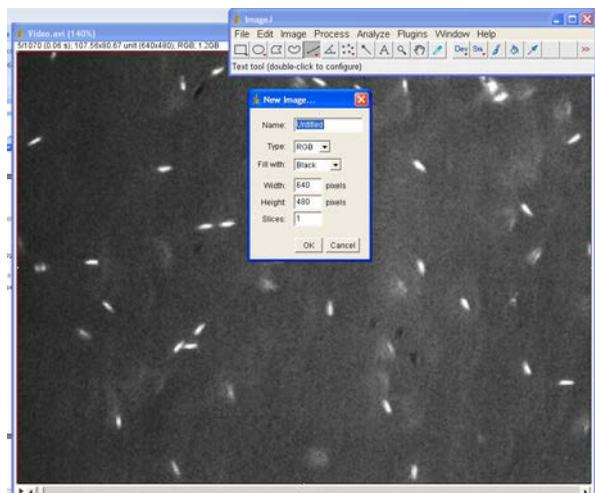
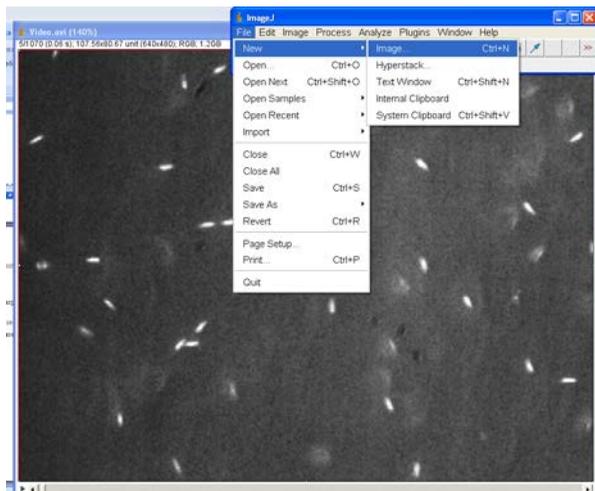
В графе **Known distance** (Известная дистанция) указываем значение 10. В графе **Unit of length** (единица измерения длины) указываем значение  $\mu\text{m}$  (микрометр). В строке **Global** необходимо поставить галочку для того, чтобы данные калибровки сохранялись при последующих измерениях. Значения калибровки подходят только для данного примера. Точное значение калибровки зависит от вида используемой калибровочной шкалы.



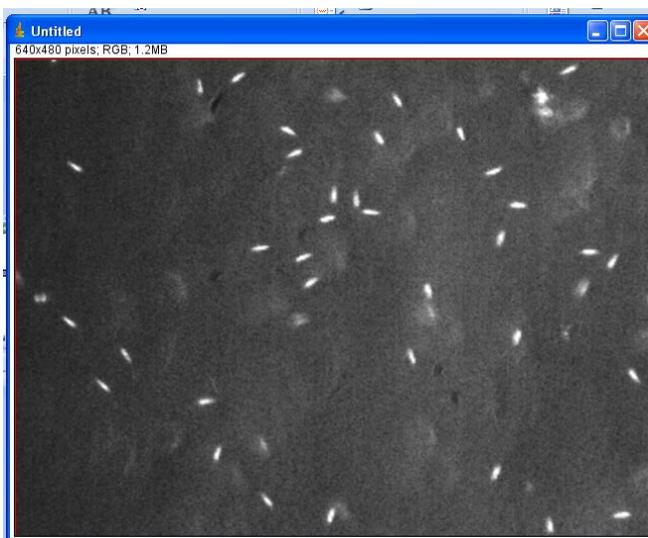
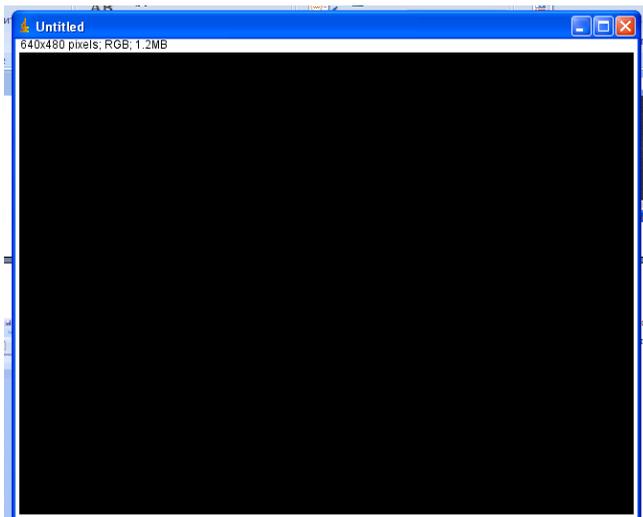
Далее открываем в программе **ImageJ** исследуемый видеоролик.



В меню видеоролика (внизу) стрелкой вправо проматываем ролик на 5 кадров. Информация о количестве кадров находится вверху ролика. Копируем изображение с ролика. Создаем новое изображение.

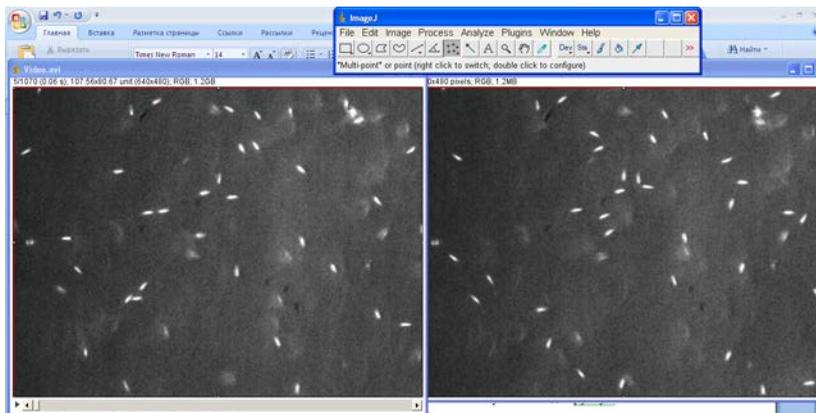


Разрешение изображения создаем одинаковое с разрешением видеоролика. В данном примере – 640×480. В открытое новое поле вставляем скопированное изображение.

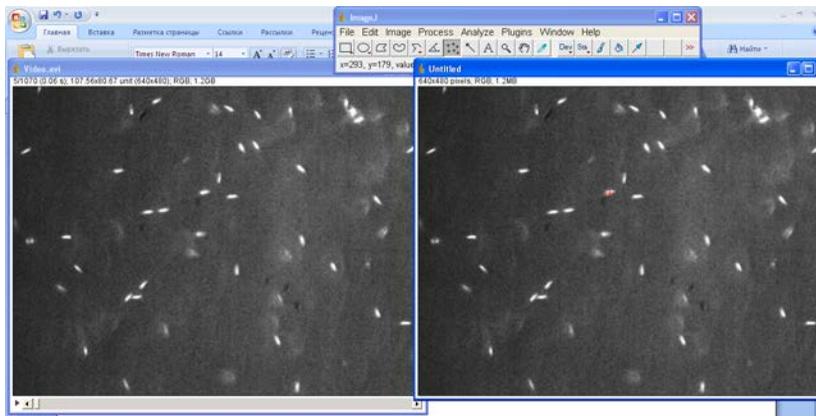


Слева видеоролик, справа начальное (с 5-го кадра) изображение – фото с видео.

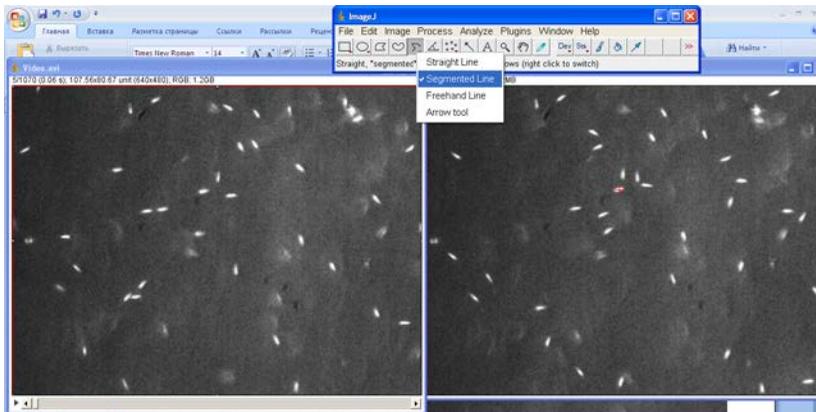
Начинаем исследования. Для этого необходимо выбрать инструмент *Multi-point*.



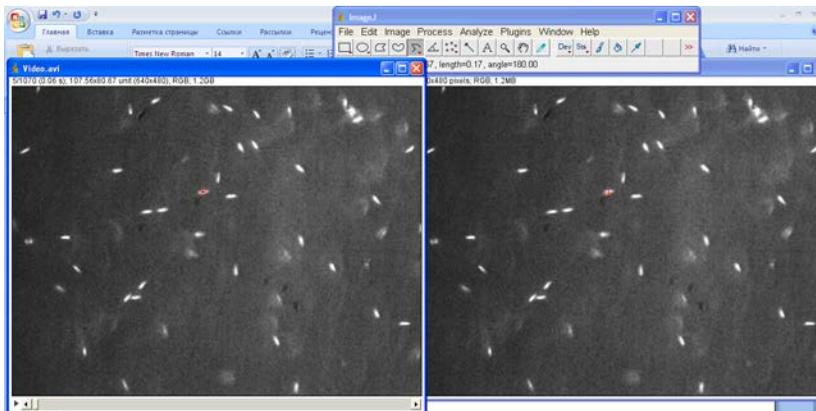
Справа выбираем сперматозоид, за которым будем наблюдать.



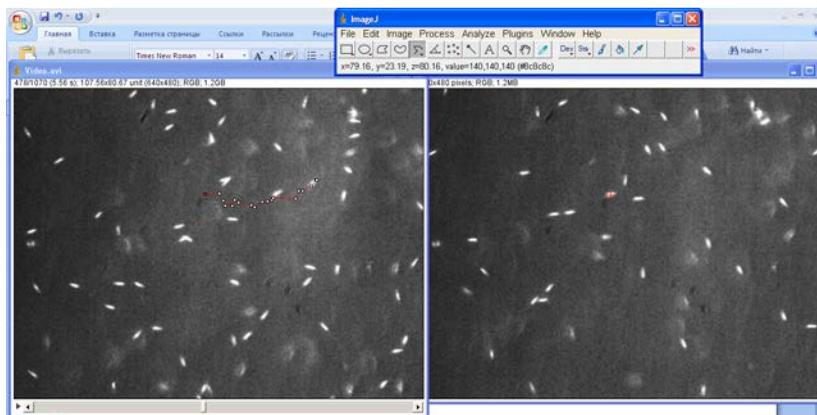
Выбираем инструмент *Segmented Line*.



В левом окне ставим курсор на выбранный сперматозоид, кликаем мышью (т. е. начинаем измерения).



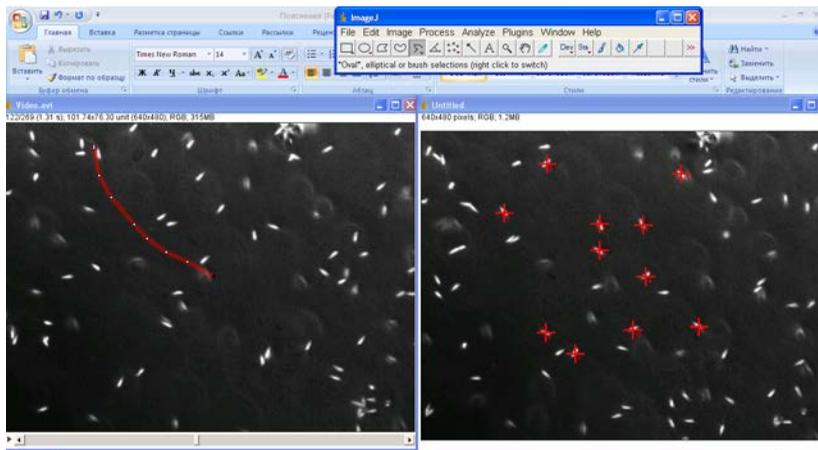
Не отводя курсор от сперматозоида, нажимаем клавишу «/». Данная клавиша запускает и останавливает видеоролик. Запускать и останавливать его необходимо очень быстро. После остановки видеоролика необходимо отметить точку перемещения сперматозоида, тем самым прорисовывая его траекторию.



Необходимо быть очень внимательным, так как некоторые сперматозоиды перемещаются очень быстро, а некоторые – медленно. Процедуру запуска/остановки видеоролика и рисования траектории сперматозоида производят до момента выхода исследуемого сперматозоида из обзора, измерения прекращают также в том случае, если сперматозоид медленно двигается. Измерения в сегментированной линейке останавливают нажатием правой кнопки мыши с последующим нажатием клавиши «М» (в английской раскладке). Далее появляется меню с измерениями, где значение 32,155 в колонке **Length** дает информацию о длине пройденного пути одним сперматозоидом в микрометрах ( $\mu\text{m}$ ), а значение 6,94 s – о времени, потраченном на прохождение данной дистанции в секундах.

Results			
File	Edit	Font	Results
	Label	Area	Length
1	Video.avi:6.94 s	5.395	32.155

Далее видеоролик возвращается на пятый кадр и осуществляется аналогичная процедура измерения с другими сперматозоидами.



На примере, указанном сверху, справа точки с исследуемыми сперматозоидами (в данном примере их 10, в исследованиях должны быть отмечены все), слева траектории на видео. Траектории не сохраняются. Каждый раз рисуется новая траектория. В графе результатов накапливаются следующие сведения:

Results			
File	Edit	Font	Results
	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	10.804
14	Video.avi:1.51 s	1.819	1.112

Результаты могут легко экспортироваться в другие программы для последующей статистической обработки.

## **6. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ИНКУБАЦИИ АРТЕМИИ ДЛЯ КОРМЛЕНИЯ РЫБОПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ЦЕННЫХ ВИДОВ РЫБ**

Кормление молоди осетровых, перешедшей на активное питание, безусловно, является одним из важнейших этапов в производственном процессе осетроводства. На сегодняшний день существуют недостаточно комбинированные корма для осетровых рыб, позиционируемые производителями как стартовые. Некоторые из них, действительно, довольно полно удовлетворяют потребности молоди, однако значимость живых кормов в этот период трудно переоценить.

Как правило, в качестве стартового корма для молоди осетровых в хозяйствах используют науплии жаброногого рачка – артемии (*Artemia salina*). Преимущества артемии хорошо известны: длительный срок хранения сухих науплий; отсутствие сложностей при транспортировке; простота и удобство получения науплий, пригодных для скармливания – все это делает артемию самым подходящим объектом для вскармливания молоди рыб.

**Методика инкубации цист артемии.** Для инкубации цист артемии используют прозрачные конусовидные сосуды вместимостью 200 л. Высокое содержание кислорода и перемешивание яиц в аппарате осуществляется путем аэрации воды с помощью компрессора, распылители которого устанавливаются в донной части аппарата. Над аппаратами обеспечивается постоянное интенсивное (2000 лк) искусственное освещение. Для инкубации активированные яйца артемии помещают в 4–5%-ный раствор поваренной соли (NaCl). Плотность закладки яиц зависит от их качества и размера и составляет в среднем 4–5 г/л. В инкубационном аппарате необходимо поддерживать температуру 27–29 °С, рН 7,5–8,5. При этих условиях выклев науплий происходит через 24–30 ч после закладки яиц. По завершении инкубации на 15 мин выключается свет и компрессор. В результате оболочки всплывают вверх, а науплии концентрируются в нижней части аппарата. После этого через сливной кран сначала сливаются мертвые и непродуктивные цисты (скапливающиеся в нижней конической части), а затем в мешок из газ-ситы (114 мкм) сливают науплий. Полученных науплий либо сразу скармливают, либо помещают в бассейны с 3–5%-ным раствором соли для дальнейшего подращивания, либо замораживают.

Рекомендуется проводить предварительную обработку (активацию и декапсуляцию) яиц артемии перед их инкубацией. Яйца артемии покрыты хитиновой оболочкой, что хорошо защищает их от внешних воздействий, но и доставляет аквариумисту немало хлопот.

Эта оболочка значительно снижает процент выхода рачков из яиц при инкубации. Кроме того, любителю необходимо будет отделять выклюнувшихся науплий от мертвых яиц и пустых оболочек, что может быть не так просто.

Декапсулированные эмбрионы более калорийны и энергичны, так как они не расходуют энергию на разрыв хитиновой оболочки. А успешно проведенная декапсуляция иногда позволяет обойтись вообще без инкубации яиц. Например, подросшая молодежь и многие взрослые рыбы с удовольствием съедят декапсулированные, но неинкубированные яйца артемии: для них это будет очень питательный и легкоперевариваемый корм. Очень любят такой корм рыбы, подбирающие его со дна: барбусы, некоторые цихлиды, сомы, а также креветки и крабы.

Активация способствует прерыванию диапаузы яиц и повышению процента выхода личинок (стоит отметить, что у яиц, продающихся в зоомагазинах в товарной упаковке, этот процесс уже прерван). Она напоминает им холодную зиму, после которой они быстрее выйдут из своей скорлупы, а также дадут лучший процент «всхожести».

Существуют следующие способы активации яиц артемии:

1. Сухие яйца кладутся в раствор поваренной пищевой или аптечной морской соли (35–47 г/л) и промораживаются при температуре –15–20 °С в течение одной-двух недель, затем в раствор бросают таблетку гидроперита (1 таблетка на 400 см<sup>3</sup> раствора), далее через 20–30 мин яйца промывают под краном водопроводной водой (5–10 с).

2. Сухие яйца кладутся в раствор поваренной пищевой или аптечной морской соли (35–47 г/л) и промораживаются при температуре –25 °С в течение 1–2 мес.

3. Сухие яйца кладутся на 30 мин в 3%-ный раствор перекиси водорода (50 г яиц на 1 л раствора), промываются и кладутся в инкубатор. Это лучший способ активации при отсутствии морозильника.

4. Сухие яйца кладутся на 2 ч в пресную воду, имеющую температуру 25–30 °С, далее отцеживаются и помещаются на сутки в раствор поваренной пищевой или аптечной морской соли (35–47 г/л). Данная операция повторяется три раза.

5. Если нет возможности проморозить яйца при температуре –25 °С, то можно положить их в морозильник в солевом растворе, пригото-

ние которого описано выше, на срок от одного дня до двух месяцев перед инкубацией.

При кормлении артемией рыб, планируемых на нерест, лучше всего подойдет второй вариант, с промораживанием не менее двух месяцев. После активации в морозильнике яйцам дают 3–4 дня отстояться при комнатной температуре перед инкубацией.

**Методика декапсуляции цист артемии.** Для улучшения технологии выклева артемии используют декапсуляцию. Метод декапсуляции цист артемии изначально применялся только для исследовательских целей, а позднее был широко внедрен в промышленную аквакультуру. Рыбоводами-практиками по достоинству была оценена возможность массового получения лишенных оболочек цист артемии в качестве стартового корма, обладающего отличными биохимическими характеристиками.

Декапсуляция – растворение хориона при сохранении живого зародыша – технологический прием, который может дать сильный импульс продвижению хозяйственного освоения артемии, поскольку эта операция резко улучшает показатели использования цист: делает излишним отделение науплий от скорлупы и неразвившихся цист, повышает «всхожесть» цист, жизнестойкость и энергетическую ценность науплий, дает гарантию от привнесения с кормом болезнетворного начала и др.

Декапсуляция цист, выполненная перед инкубацией, имеет несомненные достоинства получения науплий из нативных цист. Объясняется это тем, что неразвившиеся цисты и скорлупу очень трудно отделить от живых науплий. Будучи же заглоченными, они могут стать причиной закупорки кишечника личинок. Особенно часто это встречается у молоди стерляди и других видов, чьи личинки отличаются мелкими размерами. Кроме того, на внешней поверхности скорлупы иногда встречаются споры бактерий и растений, что также может быть небезопасным. Из цист, лишенных скорлупы, вылупляются науплии, обладающие большим запасом энергии, поскольку последняя не расходуется на работу по разрыву скорлупы и выходу из нее.

Применение декапсулированных цист непосредственно в качестве стартового корма имеет следующие преимущества: отпадает необходимость в инкубации, следовательно, не нужны инкубационные аппараты и среды, специальные помещения, системы обогрева, подачи сжатого воздуха. Исключается или резко сокращается расход электроэнергии. Не требуется отделять корм от скорлупы и неразвившихся

цист. Процесс сокращается с 48 ч до 20 мин. Устраняется зависимость производства от крайне непостоянного показателя – величины «всхожести» цист: практически все цисты используются как стартовый корм. Устраняется опасность занесения с кормом болезней рыб.

Применение метода декапсуляции заключается в следующем: сухие яйца необходимо в течение часа подержать в пресной воде, а затем поместить в следующий раствор: 50 г гипохлорита кальция и 16 г кальцинированной соды на 1 л воды. Данные вещества тщательно перемешиваются в течение 1–1,5 мин и отстаиваются, затем сливается осадок. Соотношение объемов яиц и раствора должно быть 1:10. В целом, для декапсулирования яиц подойдут препараты, содержащие активный хлор: диоксид хлора, гипохлорит натрия, гипохлорит кальция, хлорная (белильная) известь (оптимальная концентрация активного хлора в растворе 17 г/л при температуре около 20 °С). Примерная концентрация этих веществ в растворе должна быть следующей: гипохлорит кальция – 3 %, хлорная известь – 6 %, гипохлорит натрия – 9 %. Но необходимо соблюдать осторожность: декапсулирующий раствор – это едкая жидкость, которая может разъесть кожу рук, также она не должна попадать в глаза, рот, нос.

Декапсуляция длится до часа (обычно не более получаса): раствор с яйцами постоянно перемешивается вручную или посредством пузырьков от компрессора (яйца должны быть постоянно в движении). По мере своего разрушения оболочки яиц приобретают оранжевый цвет. Декапсулированные яйца могут сразу же скармливаться малькам, необходимо лишь промыть их в течение 8–10 мин проточной теплой водой. В сачках применяются только капроновые материалы (шелк разъедается хлором), емкости должны быть стойкими к коррозии.

Декапсулированные яйца хорошо хранятся в холодильнике, в плотно закрытой банке. Рекомендуется перед скармливанием замочить их в воде на 15–20 мин или залить горячей водой на 3–5 мин. Если же необходимо «законсервировать» продукт, то его хранят в насыщенном солевом растворе в течение нескольких месяцев, а по мере необходимости инкубируют или скармливают. В таком растворе личинки рачков обезвоживаются и у них приостанавливаются процессы жизнедеятельности. Для того чтобы вернуть их в нормальное состояние, необходимо положить эмбрионов в раствор с соленостью менее 80 ‰.

**Выращивание артемии в бассейнах.** Разводить, выращивать артемию можно в таких же нефилтрирующих бассейнах, которые применяются для разведения ветвистоусых рачков, но изготовленных из соле-

устойчивого бетона или пластика. Для этого в бассейнах создают соленость от 40–50 ‰ и запускают взрослых артемий (10 г на 1 м<sup>3</sup>) или вносят яйца артемии из расчета 500–600 г/м<sup>3</sup>. В природе главной пищей рачков *A. salina* является микроводоросль *Dunaliella salina*, а также бактерии грунта и органические остатки. Для развития протококковых водорослей в бассейн вносят культуру *Chlorella* (1 млн. клеток на 1 мл) и растворенные в воде соли (из расчета 0,1 кг/м<sup>3</sup> глауберовой соли (сернокислого натрия), 0,05 кг/м<sup>3</sup> азотнокислого калия и 0,05 кг/м<sup>3</sup> суперфосфата).

В качестве корма для артемии можно использовать кормовые дрожжи, которые вносят в растворенном виде по всей площади бассейна из расчета 0,01 кг/м<sup>3</sup>. Начиная с третьего дня после вылупления науплий кормовые дрожжи вносят 1 раз в 5 суток из расчета 20 г/м<sup>3</sup>. Когда рачки *Artemia* становятся половозрелыми, частоту кормления увеличивают до 1 раза в 3 суток, а при их массовом размножении кормовую норму повышают до 35 г/м<sup>3</sup>. Оценивать условия содержания артемии и обеспеченность ее кормом можно визуально по поведению рачков. Равномерное распределение артемий в толще воды указывает на нормальные условия среды, их скопление у дна и стенок бассейна характеризует недостаточность кормовой базы. Концентрация рачков у поверхности воды и их замедленные движения свидетельствуют о дефиците кислорода. Отлов артемий начинают, когда в бассейне на одну половозрелую особь приходится не менее десяти неполовозрелых рачков. В этом случае допустимая норма изъятия культуры составляет  $\frac{1}{3}$ – $\frac{1}{2}$  всей биомассы или 100–120 г/м<sup>3</sup>. Для получения устойчивого выхода продукции необходимо поддерживать в бассейнах стабильную концентрацию поваренной соли и содержание растворенного в воде кислорода (на уровне не менее 4 мг/л), способствующих выклеву науплий. По окончании рыбоводного сезона яйца артемии можно оставлять в бассейнах на зиму.

**Биоинкапсуляция науплий артемии.** Для снижения коэффициента конверсии корма и, соответственно, увеличения выживаемости, темпов роста личинок и их устойчивости к стрессу рекомендуется использовать метод биоинкапсуляции – обогащение науплий артемии ω-3 высоконенасыщенными жирными кислотами.



Рис. 137. Схема обогащения (биоинкапсуляция) науплий артемии (NF – раствор фуразолидона, 3 мг/л)

Для повышения темпов роста и качества личинок осетровых также используют способ биоинкапсуляции науплий артемии пробиотиками. Науплии артемии перед использованием в кормлении личинок осетровых выдерживают в течение 10 ч в бактериальной суспензии (*Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *B. polymixa*, *B. laterosporus*, *B. circulans* – коммерческое название «Protexinaquatic»). Наилучшие результаты при кормлении личинок шипа (*A. nudiventris*) биоинкапсулированными науплиями *Artemia urmiana* были получены при использовании концентраций бактериальной суспензии  $3 \times 10^5$  бактерий/мл (КОЕ/мл).

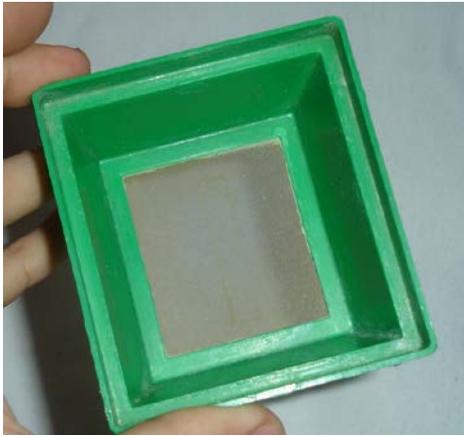
Существует множество доступных препаратов для обогащения артемий. Так как эти продукты имеют различный состав, питательную ценность и протоколы обогащения, то решать, какой из них наиболее подходит для условий выращивания и определенных видов рыб надлежит менеджерам по выклевыванию яиц. Когда препарат для обогащения уже выбран, важно вести стандартизированный протокол и неуклонно ему следовать. Небольшие изменения в температуре или времени обогащения, например, могут сильно влиять на размер и питательные качества получаемого продукта. Получение витаминизированных артемий требует запаса времени в два дня: первый день необходим для

выклева артемий, второй день – для их обогащения. Чтобы облегчить этот процесс, необходим второй резервуар, специально для витаминизации. Как и в случае с выклевом, идеальным будет резервуар с коническим дном, что поможет обеспечить тщательное смешивание артемий и полное высыхание их во время сбора. Перед процедурой резервуар для обогащения необходимо наполнить подходящим количеством воды, причем параметры качества воды (температура, соленость и pH) должны быть отрегулированы таким образом, чтобы соответствовать условиям, описанным выше. Важно начинать процесс обогащения с использования здоровых, высококачественных науплий. Науплии, которые еще до обогащения были вялыми или поврежденными, в результате станут субоптимальным питательным веществом. Необходимо аккуратно удалять пустые яйца (недекапсулированные яйца) и мембраны после выклева (от декапсулированных яиц) таким образом, как описано в разделе о выклеве яиц артемий. Науплии артемий также должны быть хорошо промыты перед помещением в резервуар для обогащения. Это особенно важно при использовании в процессе выклева таких добавок, как INVE's Hatch Controller и пеногаситель, так как ингредиенты этих продуктов могут помешать процессу обогащения. Во время процесса обогащения необходимо установить энергичную аэрацию через дно резервуара, а также тщательно отслеживать уровень растворенного кислорода в течение всего процесса. Во время этой стадии скорее всего понадобится использование дополнительного кислорода, чтобы поддерживать уровень кислорода более 4 мг/л. Следует поддерживать температуру на уровне 25 °C с помощью подводных нагревателей либо горстки льда, в зависимости от окружающих условий. В конце процесса обогащения вся масса воды должна быть процежена сквозь сачок (125 мкм) со значительной аэрацией, чтобы обогащенные артемий не оседали. Уровень кислорода в сачке необходимо тщательно отслеживать. Артемий тщательно промывают в течение 5 мин или до тех пор, пока вытекающая вода не станет прозрачной.

**Методика оценки эффективности выклева артемий и проведения инкубации в условиях *in vitro*.** Сначала осуществляют процедуру гидратации, т. е. цисты насыпают в воду на 1–2 ч. За это время они набухают, что облегчит декапсуляцию. Оптимальное количество артемий для декапсуляции устанавливают в процессе собственного опыта. Начинать рекомендуется с 1–1,5 чайной ложки.



После гидратации цисты процеживают. Для этого можно использовать какую-нибудь мелкую ткань. Лучше изготовить такую конструкцию, чтобы сетка или ткань находилась в натянутом состоянии.





Далее цисты помещают в 70%-ный спирт. Время зависит от интенсивности перемешивания: при периодическом помешивании – 2 мин, без перемешивания – 5 мин.



После спирта цисты обильно промывают. Далее их помещают в белизну. Время зависит от интенсивности перемешивания: при периодическом помешивании – 2 мин, без перемешивания – 4 мин. Время нужно контролировать очень четко, так как передержка токсически действует на цисты и науплии. Оптимальное время (от 1 до 5 мин) подберется в процессе собственного опыта, так как концентрация гипохлорита натрия в белизне несколько изменяется в зависимости от производителя.



Заранее готовят среду для инкубации. Для этого артезианскую воду в течение 5–10 мин аэрируют с помощью аквариумного компрессора.



После аэрации в воду добавляют пищевую соль (не йодированную!!!) в количестве 1 чайная ложка на 250 мл воды.



После декапсуляции в белизне цисты процеживают и обильно промывают (очень важно после белизны обильно промыть их до отсутствия запаха хлора).

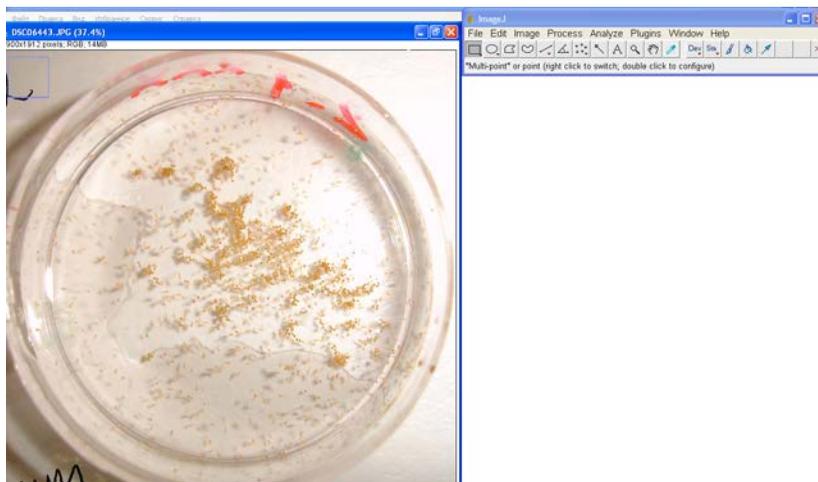
Затем цисты разносят по чашкам Петри или другим лабораторным контейнерам. Важно не давать цистам после декапсуляции подсыхать, иначе они будут слипаться. Для отбора и разнеса цист по чашкам Петри необходимо подобрать единый инструмент. Можно использовать наконечник от дозатора, трубку от стержня шариковой ручки, трубочку от ватной палочки и т. п. Объем цист для каждой чашки Петри – около  $\frac{1}{3}$  спичечной головки. Это примерно 500–1 000 цист. Перед тем как цисты поместить в чашки Петри, в них наливают инкубирующую среду – около 500–1 000 мл (это предотвратит цисты от подсыхания во время воздействия какого-нибудь физического фактора). В среду помещают цисты круговыми движениями, чтобы они распространились как можно дальше друг от друга (для предотвращения слипания). Объем среды зависит от используемых емкостей. Как правило, уровень инкубирующей среды в емкости должен составлять 5–7 мм (для 4-сантиметровой чашки Петри – это 5 мл раствора). Далее чашки Петри маркируют и помещают для инкубации при температуре не менее 25 °С (наиболее оптимальная 28–29 °С). Можно инкубировать в условиях полного затемнения (например, в термостатах). В зависимости от

температуры выклев начнется через 24 ч (единичные особи). Массовый выклев науплий – через 48 ч.

Чашки Петри фотографируют цифровым фотоаппаратом с включенной функцией макростемки. Для фотографирования лучше использовать штатив. Если есть возможность, то фотоаппаратом лучше управлять с компьютера с помощью специализированной программы (в зависимости от модели фотоаппарата, например Adobe Photoshop Lightroom). Использование штатива и программного управления будет способствовать уменьшению вибрации в процессе фотографирования для получения более качественных снимков. Также важно подобрать фон, на который будет ставиться чашка Петри. Фон не должен давать бликов (например, матовый материал) и должен быть водостойким.

Для оценки эффективности выклева артемии необходимо скачать и установить себе на компьютер программу ImageJ по веб-ссылке: <http://imagej.nih.gov/ij/download/win32/ij148-jdk6-setup.exe> или на сайте: <http://imagej.nih.gov/ij/>.

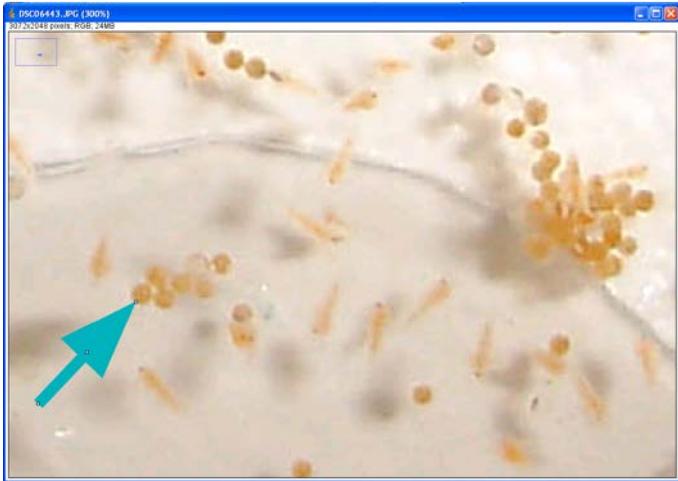
После установления открываем изображение с артемией после выклева.





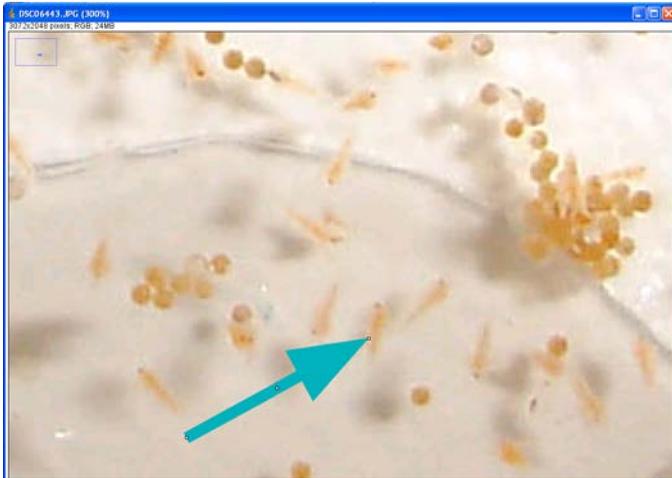
При хорошем качестве фотоаппарата и изображения цисты и науплии различимы. На рисунке стрелкой выделены круглые цисты (т. е. оболочки, из которых выклюнулись артемии).





Стрелкой также выделены продолговатые науплии артемии.

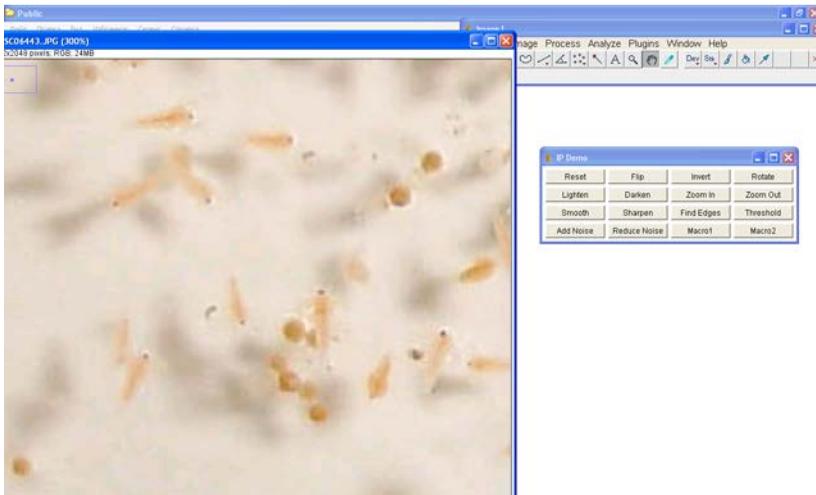


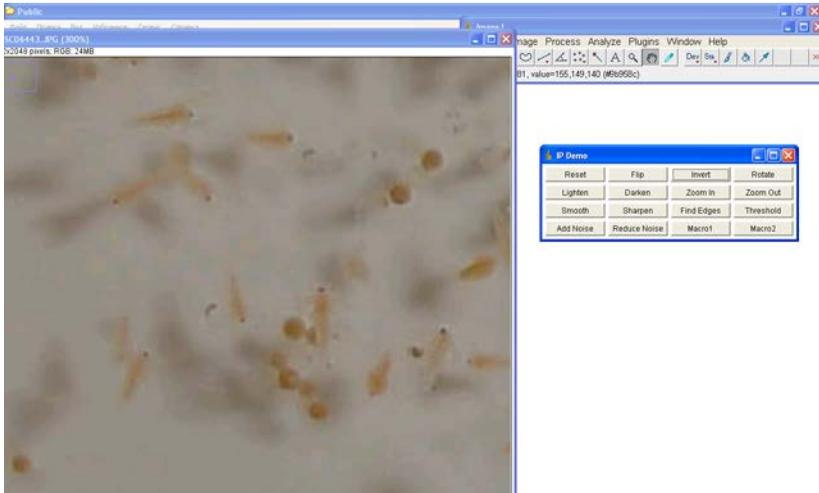


Для удобства визуализации можно инвертировать изображение:  
Plugins / Examples / IP Demo.

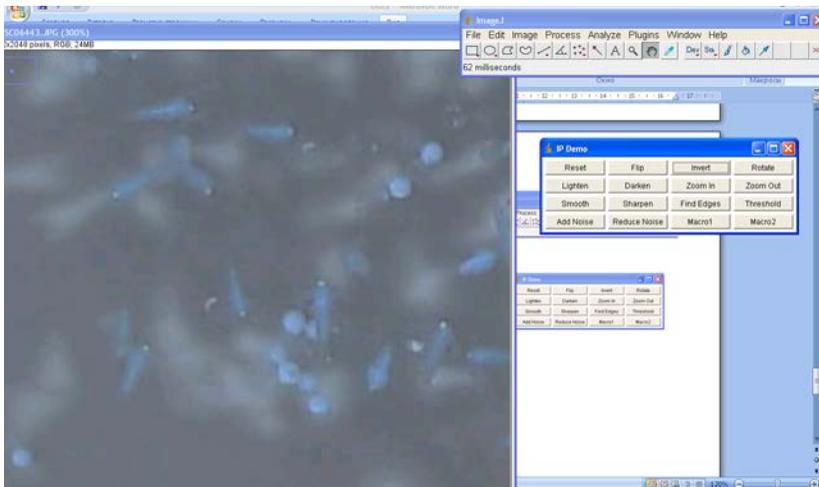


Далее регулируем яркость (Darken / Lighten).

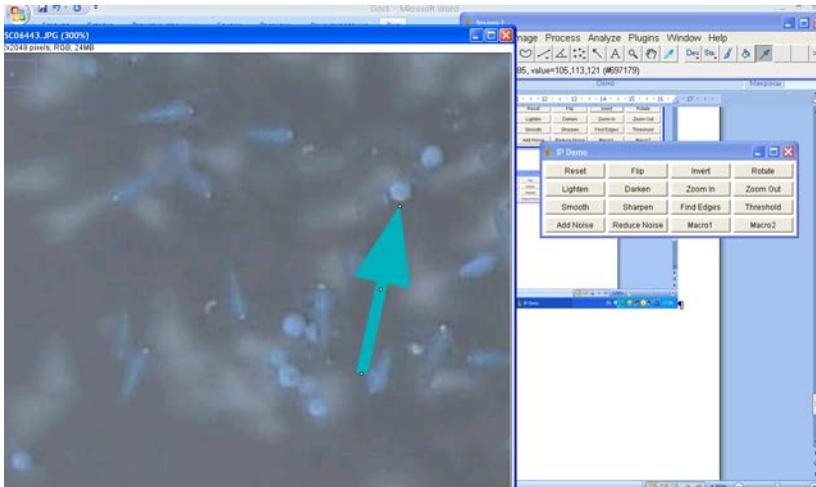




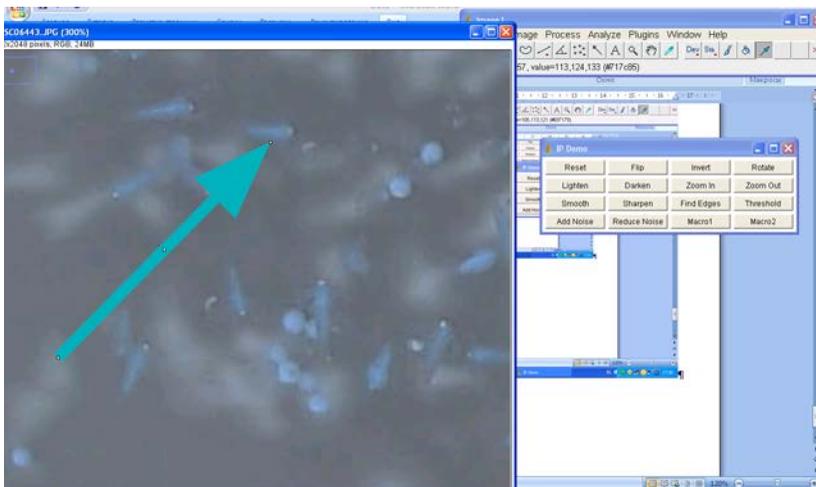
И выбираем *Invert*.



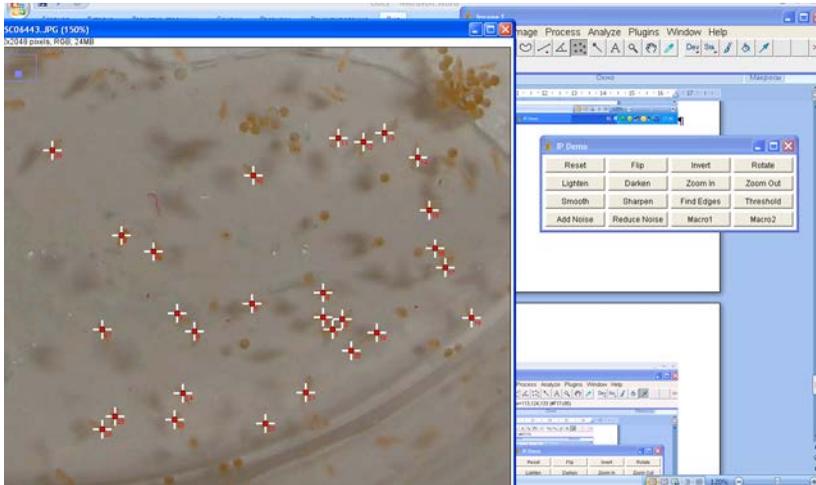
Круглые пятна – это оболочки (цисты).



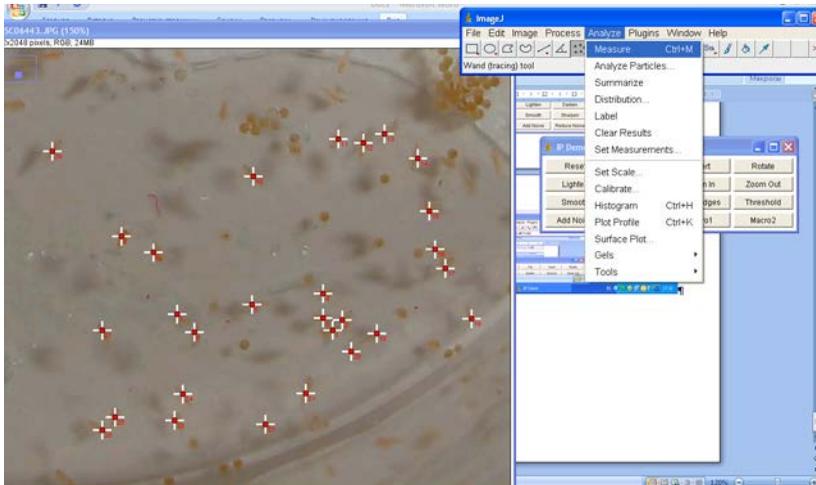
Продолговатые пятна – это науплии артемии.

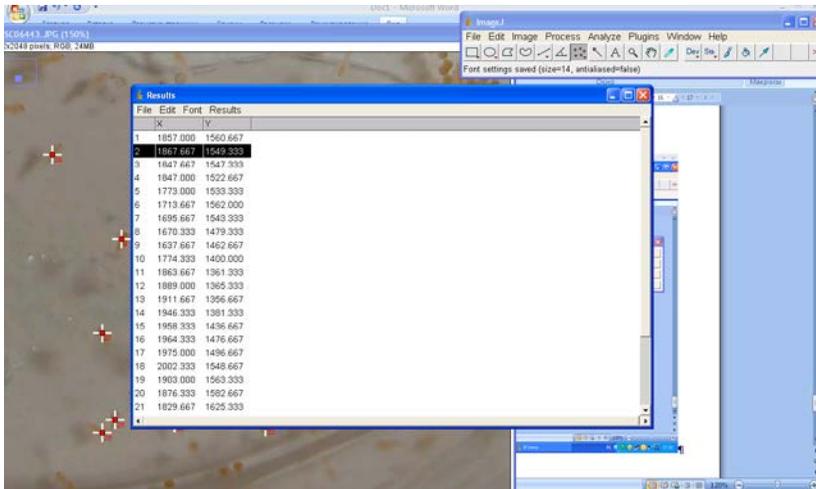


Подсчет рачков осуществляют с помощью инструмента *Multi-point*.



Измеренное количество науплий можно увидеть в результатах подсчета: Analyze / Measure / Result.



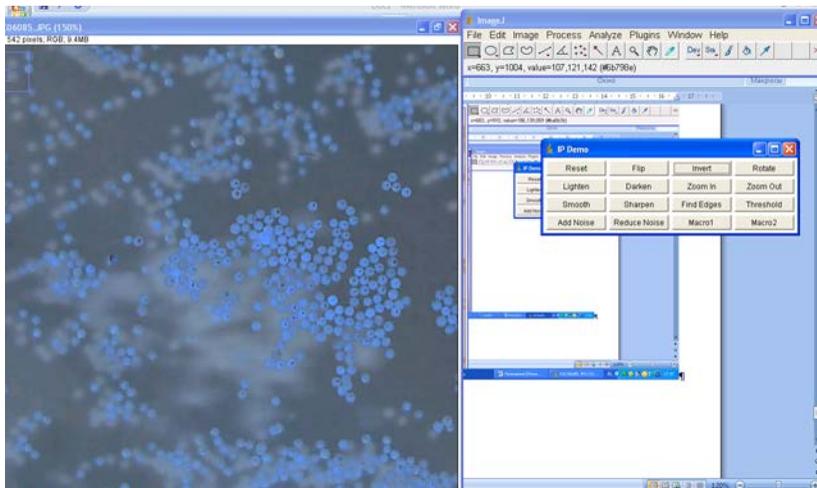
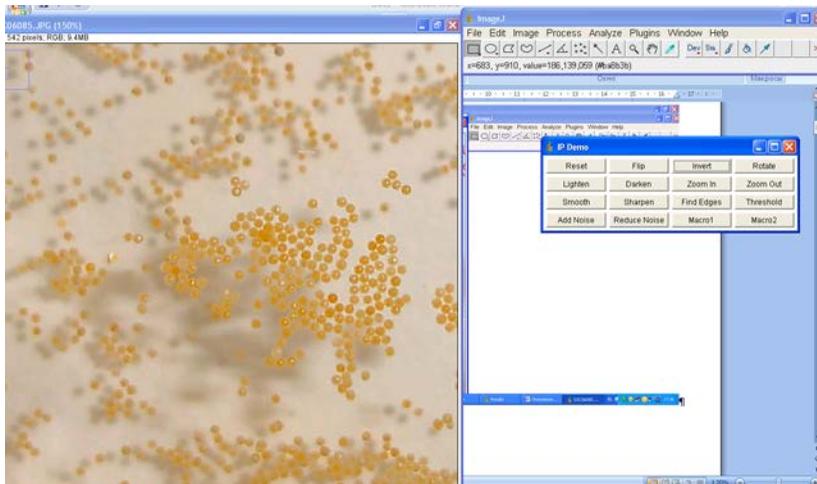


Основным параметром для контроля является процент выклева науплий из цист через определенное количество времени (количество науплий / количество цист). Его контролировать через 24 и (или) 48 ч.

Исходное количество цист определяют на отдельном фото, которое делают непосредственно после закладки пробы на инкубацию.



Для удобства подсчета изображение можно инвертировать.



Ниже представлен образец оформления результатов оценки эффективности выклева артемии с помощью программы ImageJ.

**Отчет о проведении оценки образцов артемии по параметру выклева.** Для оценки артемии по параметру выклева (в %) поступило 3 образца. Инкубация цист артемии, а также подсчет науплий производились на основании общепринятых инструкций. Оценка каждого образца осуществлялась в пяти повторностях. Результаты оценки артемии по параметру выклева представлены в табл. 22.

Таблица 22. Результаты оценки артемии по параметру выклева

Группа	Mean $\pm$ SE, %	SD	CV, %	<i>n</i>	Min – max
Образец 1	72,12 $\pm$ 2,47	5,52	0,07	5	64,7–79,2
Образец 2	87,88 $\pm$ 1,62	3,63	0,04	5	82,6–92,0
Образец 3	22,40 $\pm$ 2,85	6,37	0,28	5	15,7–32,0

Примечание. Mean – среднее значение массы, SE – стандартная ошибка среднего, SD – стандартное отклонение, CV – коэффициент вариации, *n* – объем выборки, min – max – минимальное и максимальное значение.

Как видно из представленных в таблице данных, у образца 1 средний процент выклева составил 72,12 %, у образца 2 – 87,88 %, у образца 3 – 22,40 %, т. е. максимальный средний выклев был у образца 2.

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
1. Рекомендации по формированию ремонтно-маточных стад для икорного осетроводства с применением биохимических, гормональных и ультразвуковых методов.....	5
1.1. Методика проведения исследований.....	5
1.2. Исследование активности аспартатаминотрансферазы (AST) ремонтно-маточного стада осетровых рыб.....	7
1.3. Исследование активности аланинаминотрансферазы (ALT) ремонтно-маточного стада осетровых рыб.....	16
1.4. Исследование активности щелочной фосфатазы (ALP) ремонтно-маточного стада осетровых рыб.....	21
1.5. Исследования активности $\gamma$ -глутамилтрансферазы (GGT) ремонтно-маточного стада осетровых рыб.....	30
1.6. Методика диагностики пола и стадий зрелости осетровых рыб. Ультразвуковая диагностика ремонтно-маточного стада осетровых рыб.....	34
1.7. Исследование репродуктивной функции ремонтно-маточного стада осетровых рыб методом ИФА-анализа.....	49
1.8. Биохимические исследования сыворотки крови ремонтного стада осетровых рыб.....	68
2. Рекомендации по применению оптического излучения низкой интенсивности в технологии воспроизводства осетровых рыб.....	71
2.1. Низкоинтенсивное оптическое излучение: основные свойства и взаимодействие с биологическими системами. Применение в сельском хозяйстве и аквакультуре.....	71
2.2. Способ стимуляции размерно-весовых показателей молоди осетровых рыб.....	84
2.3. Способ повышения токсикоустойчивости молоди осетровых рыб.....	91
2.4. Способ повышения устойчивости молоди осетровых рыб к дефициту кислорода.....	97
2.5. Способ повышения терморезистентности стандартной молоди осетровых рыб.....	103
2.6. Способ повышения репродуктивных качеств производителей осетровых рыб.....	109
2.7. Способ повышения активности сперматозоидов самцов осетровых рыб.....	114
2.8. Способ обработки спермы рыб.....	118
2.9. Установка для инкубации икры.....	122
2.10. Лазерно-оптический прибор для инкубации икры «Sturgeon».....	127
2.11. Рекомендации по использованию эмбрионов осетровых рыб в исследованиях <i>in vitro</i> (на примере изучения поляризации и когерентности оптического излучения).....	136
2.11.1. Исследование зависимости биологического действия излучения от типа его поляризации.....	136
2.11.2. Исследование зависимости биологической активности излучения от его временной когерентности.....	140
3. Технология зимовки ремонтно-маточных стад осетровых.....	146
4. Рекомендации по проведению мониторинга эмбрионального развития осетровых рыб в период инкубации.....	152

5. Рекомендации по проведению компьютерного анализа качества сперматозоидов осетровых рыб.....	162
6. Рекомендации по проведению инкубации артемии для кормления рыбопосадочного материала ценных видов рыб.....	179

Учебное издание

**Барулин** Николай Валерьевич  
**Плавский** Виталий Юльевич  
**Шумский** Константин Леонардович и др.

РЕКОМЕНДАЦИИ  
ПО ВОСПРОИЗВОДСТВУ ОСЕТРОВЫХ РЫБ  
В РЫБОВОДНЫХ ИНДУСТРИАЛЬНЫХ КОМПЛЕКСАХ  
С ПРИМЕНЕНИЕМ ИННОВАЦИОННЫХ МЕТОДОВ

Редактор *Н. Н. Пьянусова*  
Технический редактор *Н. Л. Якубовская*

Подписано в печать 05.12.2016. Формат 60×84 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бумага офсетная.  
Ризография. Гарнитура «Таймс». Усл. печ. л. 11,86. Уч.-изд. л. 10,11.  
Тираж 50 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.