

**ИННОВАЦИОННАЯ ТЕХНОЛОГИЯ УПРАВЛЕНИЯ ПРОЦЕССАМИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ РЫБ НА РАННИХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА**

*Методами биохимического и морфологического анализов исследована интенсивность процессов свободнорадикального перекисного окисления липидов у эмбрионов зеркального карпа при традиционной и новой технологиях аквакультуры. Установлено влияние окислительного стресса на темпы дробления и гастрюляции у эмбрионов рыб. Предложена технология управления свободнорадикальными процессами в организме рыб на ранних этапах онтогенеза с использованием антиоксиданта нового поколения «Тиофан».*

**Ключевые слова:** аквакультура, икра, эмбрион, антиоксидант, окислительный стресс.

*O.V. Keberlayn, A.V. Sakharov, A.A. Makeyev,  
A.E. Prosenko, J.V. Safyanov*

**INNOVATIVE TECHNOLOGY OF PROCESSES CONTROL FOR FREE RADICAL PROTECTION OF FISH IN THE EARLY STAGES OF ONTOGENESIS**

*The intensity of the free radical lipid peroxidation in the embryos of mirror carp by methods of biochemical and morphological analysis with traditional and new technologies of aquaculture is studied in the article. The effect of oxidative stress on the rate of cleavage and gastrulation in the embryos of fish has been established. The technology of free radical processes control in fish early ontogenesis using a new generation anti-oxidant "Thiophane" is suggested.*

**Key words:** aquaculture, hard-roe, embryos, antioxidant, oxidative stress.

В условиях критического снижения рыбных запасов внутренних водоемов аквакультура рассматривается в качестве одного из надежных источников увеличения рыбной продукции. Лежащее в ее основе товарное выращивание гидробионтов представляет собой значительную часть сельскохозяйственного производства продуктов питания и является важнейшим механизмом регулирования экономики, средством реализации социальных и экологически значимых проектов [9]. Уже не вызывает сомнения, что в ближайшем будущем удовлетворение все возрастающих потребностей населения в рыбопродуктах будет осуществляться преимущественно за счет аквакультуры. В передовых странах, на долю выращенных в условиях специализированных предприятий приходится около половины потребляемого объема рыбопродуктов, что определяет актуальность развития данного направления в обеспечении продовольственной безопасности страны. Повышение роли научных исследований в практическом рыбоводстве требует внедрения новых конкурентоспособных технологий [9]. Современные методы и подходы аквакультуры направлены на снижение влияния неблагоприятных факторов среды, создание максимально комфортных условий для эмбрионального развития рыб и рассматриваются как составная часть управления процессами онтогенетического развития. Недостаточность информации в отношении реализации механизмов адаптации эмбрионов рыб к «технологическим» нагрузкам явилось основанием для выяснения роли свободнорадикального перекисного окисления липидов (СПОЛ) в осуществлении генетически детерминированной программы эмбрионального развития рыб в условиях аквакультуры.

**Цель исследования** – изучить возможности управления свободно-радикальными процессами в организме рыб на ранних этапах эмбрионального развития в условиях аквакультуры с использованием антиоксиданта нового поколения «Тиофан».

**Материал и методы исследования.** Особенности развития эмбрионов карпа на ранних сроках развития изучали на нативных и гистологических препаратах в проходящем свете с использованием комплекса оптико-структурного анализа «Olimpus BBS». В ходе эксперимента всю икру разделили на две группы. В контрольной группе обесклеивание икры производили молоком из расчета 0,5 л молока на 8 л воды. В опытной группе обесклеивание икры осуществлялось 1%-м масляным раствором серосодержащего антиоксиданта нового поколения «Тиофан» в составе высокодисперсной эмульсии из расчета 0,5 л раствора на 8 л воды. Все исследования были проведены в десяти повторах. В ходе инкубации на всем протяжении эксперимента соблюдались технологические требования, регламентируемые соответствующими инструкциями [10].

Абсолютное содержание биогенных элементов – кальция, меди, цинка, железа, марганца, калия и натрия – в гомогенатах икры определяли методом атомно-эмиссионного анализа с индуктивно связанной плазмой [5]. Локализацию кальция в клетках эмбрионов определяли методом гистохимического анализа по Крэтену [6].

Параметры окислительного стресса и активность ферментов антиоксидантной защиты рыб в гомогенатах икры определяли спектрофотометрически, при соответствующей длине волны. Статистическую обработку данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Наличие в составе липидов икры рыб высокого содержания моно- и полиненасыщенных жирных кислот, которые являются легкоаутооксидабельными компонентами, определяет возможность развития реакций СПОЛ при изменении условий внешней и внутренней среды [1]. В аквакультуре получение половых продуктов от производителей нефизиологическим способом, а затем искусственное оплодотворение икры на воздухе, могут сопровождаться ее гипероксигенацией и, как следствие, повышением уровня СПОЛ. Выдвинутое предположение доказывается результатами биохимического анализа. Уровень первичных продуктов СПОЛ – диеновых конъюгатов (ДК) в гомогенатах неоплодотворенной икры на воздухе статистически достоверно превышает данный показатель в аналогичных образцах икры, полученной от самок в воде (рис. 1). При этом в образцах икры, полученной от самок в воде, активность каталазы (КАТ) ниже, чем в образцах икры, изъятых от производителей на воздухе. Полученные результаты позволяют считать, что в условиях аквакультуры технологические процессы получения половых продуктов на воздухе и сухой метод оплодотворения способствуют развитию в икре рыб окислительного стресса (ОС). Увеличение активности КАТ можно рассматривать как адаптивную реакцию на повышение СПОЛ в яйце, направленную на защиту молекул органических веществ икры от активных кислородных метаболитов (рис. 1). Следовательно, при традиционной технологии аквакультуры уже на ранних этапах эмбрионального развития в яйце происходит изменение активности метаболических процессов, требующих перераспределения трофического материала и энергетических ресурсов, направленных на антирадикальную защиту органических компонентов икры.

Как известно, после оплодотворения икры и запуска генетически детерминированной программы развития происходит активация яйца [2, 3]. Этот процесс сопровождается каскадом катаболических реакций с вовлечением в окислительный процесс органических субстратов икры. Результаты биохимического анализа гомогенатов икры, полученной *ex tempore* после оплодотворения, позволяют считать, что повышенный уровень активности КАТ блокирует развитие СПОЛ и снижает содержание ДК (рис. 1).

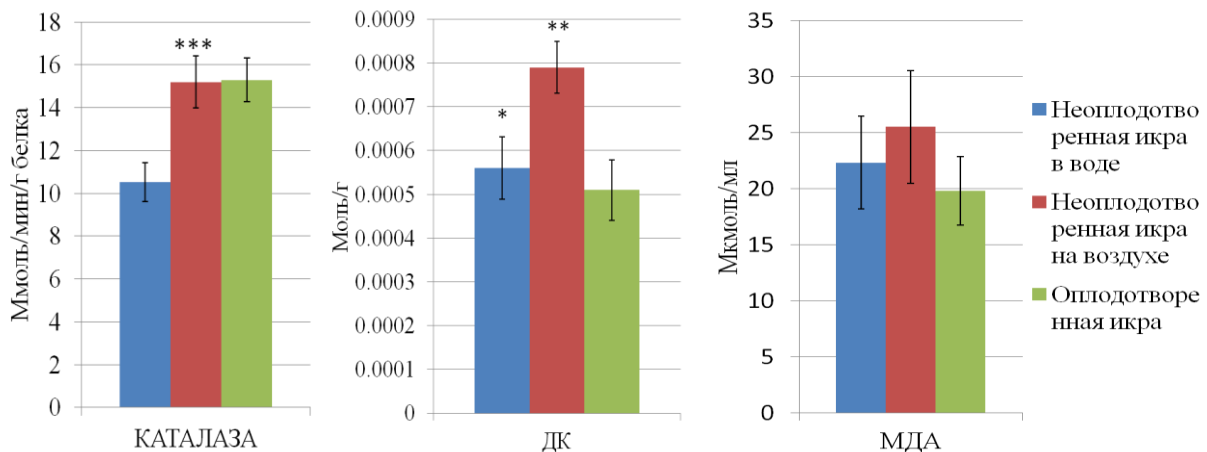


Рис. 1. Интегральные показатели активности свободнорадикального перекисного окисления липидов при получении икры различными способами. Примечание: статистически достоверные различия между показателями контрольной и опытной групп (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ )

Таким образом, при традиционной технологии искусственного разведения рыб высокий уровень СПОЛ вызывает напряжение несовершенной системы антиоксидантной защиты рыб и развитие ОС на ранних этапах онтогенеза. Возможность управления данными процессами оценивалась при использовании антиоксидантных соединений в составе масляной эмульсии при обесклеивании икры.

Результаты исследования показали, что использование полифункционального серосодержащего антиоксиданта нового поколения «Тиофан» в период обесклеивания икры способствует сохранению высокой активности КАТ в ее гомогенатах по сравнению с контролем во временном интервале от 40 мин до 10 ч развития эмбрионов (рис. 1).

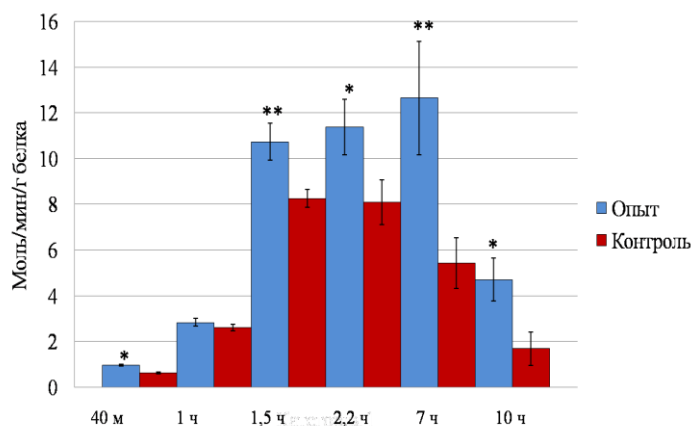


Рис. 2. Исследование активности каталазы на ранних этапах развития эмбрионов зеркального карпа. Примечание: статистически достоверные различия между показателями контрольной и опытной групп (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ )

Полученные данные позволяют считать, что реализация антиоксидантом «Тиофан» своих специфических свойств обеспечивает ограничение СПОЛ, способствует рациональному расходованию КАТ и собственных антиоксидантных соединений яйца. В исследуемый временной интервал развития эмбрионов, а именно: от начала дробления и до наступления эпиболии (10 ч) – снижение активности данного фермента на сроке 10 ч эмбриогенеза, вероятно, связано с истощением естественных антиоксидантных соединений, прежде всего, каротиноидов, локализованных в икре (рис. 2).

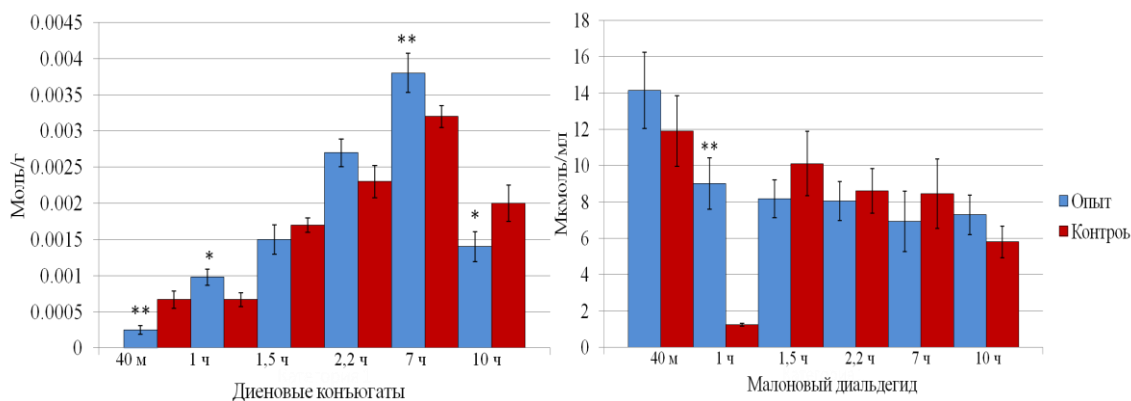


Рис. 3. Исследование первичных и вторичных продуктов свободнорадикального перекисного окисления липидов на ранних этапах развития эмбрионов зеркального карпа. Примечание: статистически достоверные различия между показателями контрольной и опытной групп (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ )

Исследование содержания продуктов СПОЛ в гомогенатах икры контрольных и опытных образцов показало, что в динамике индивидуального развития от 40 мин до 7 ч отмечается повышение уровня ДК и снижение МДА (рис. 3). С нашей точки зрения, повышение содержания первичных продуктов СПОЛ является следствием интенсивного расходования трофического материала икры на обеспечение морфогенетических процессов. В этой связи можно полагать, что чем интенсивнее развитие эмбрионов, тем выше СПОЛ. Несмотря на его высокий уровень в образцах икры опытной группы, активность КАТ остается более высокой по

сравнению с контролем в течение данного периода, что указывает на отсутствие ОС [4]. Снижение уровня вторичных продуктов СПОЛ в икре обеих групп можно объяснить ограничением свободнорадикальных процессов за счет реализации механизмов антиоксидантной защиты. Сравнительный анализ опытных и контрольных образцов показал, что через 10 ч после применения антиоксиданта «Тиофан» активность КАТ в гомогенатах икры опытных образцов оставалась статистически достоверно выше, а содержание первичных продуктов СПОЛ имело достоверно низкий показатель по сравнению с контролем. Представленный анализ позволяет сделать важное заключение о возможности управления свободнорадикальными процессами на ранних этапах онтогенеза рыб за счет использования антиоксидантных соединений.

Доказательство более высокого уровня развития эмбрионов в опытной группе по сравнению с контролем основывается на результатах морфологического анализа. На нативных препаратах икры в проходящем свете отчетливо заметно, что эмбрионы контрольной группы находятся на стадии мелкоклеточной морулы, а эмбрионы опытной группы в тот же промежуток времени – на стадии эпиволии (рис. 4). По данным морфометрического анализа, диаметр икры и ширина перивителлинового пространства в контрольной группе превышали соответствующие значения опытных образцов (табл. 1). Данные показатели отражают интенсивность набухания икры и уровень обменных процессов эмбрионов с окружающей средой.

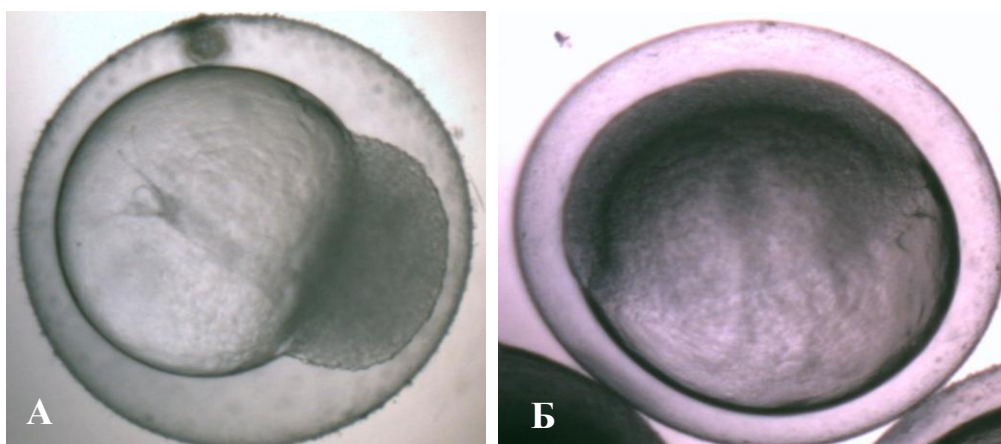


Рис. 4. Икра зеркального карпа через 10 часов после оплодотворения: А – контрольная группа; Б – опытная группа. Нативный препарат. Ув. 40 х.

Таблица 1

**Морфометрическая характеристика икры зеркального карпа через 40 мин после оплодотворения**

Группа	Диаметр икры, мкм	Диаметр желтка, мкм	Площадь желтка, мм <sup>2</sup>	Высота бластодиска, мкм	Ширина перивителлинового пространства, мкм
Контроль	1850,97±19,6***	1307,99±37,6	1341,12±76,17	183,92±15,7	220,94±19,9*
Опыт	1730,14±11,9	1327,88±36,8	1400,86±78,60	163,36±36,2	148,28±26,08

Примечание: статистически достоверные различия между показателями контрольной и опытной групп (\* $p \leq 0,05$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

Считается, что чем больше перивителлиновое пространство, тем более интенсивно протекают процессы обмена организма эмбрионов с внешней средой [2, 3]. Увеличение ширины перивителлинового пространства в контрольных образцах икры по сравнению с опытными позволяет считать, что обменные процессы, а следовательно, и развитие эмбрионов данной группы должны протекать более интенсивно, чем в опытной группе. Это противоречит полученным результатам биохимического анализа.

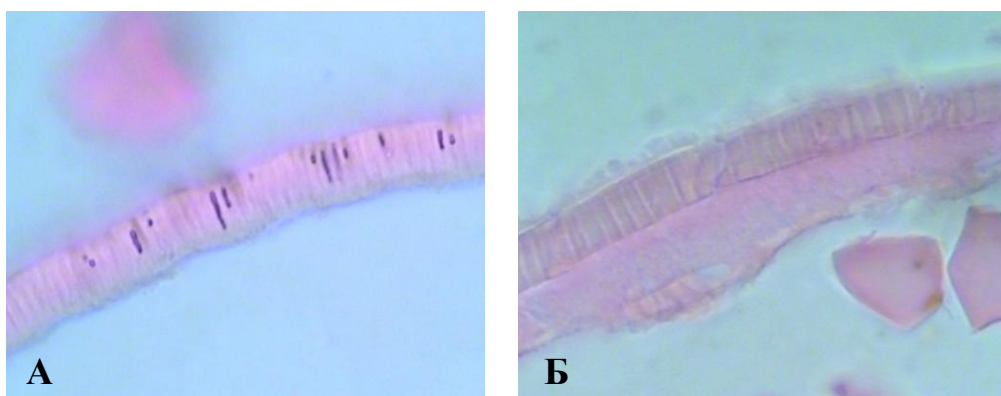


Рис. 5. Кальций в канальцах оболочки икры: А – контрольная группа; Б – опытная группа. Реакция на кальций по Кретэну. Ув. 400 х.

Опровержением вышеизложенной гипотезы служат данные гистохимического и атомно-эмиссионного анализов. На рисунке 5 отчетливо видны ионы  $Ca^{2+}$  в канальцах оболочки икры контрольной группы. Согласно данным таблицы 2, содержание  $Ca^{2+}$  в образцах икры контрольной группы достоверно выше, чем в икре опытной группы. Установлено, что АКМ влияют на фазовое состояние липидного бислоя мембран, усиливают гидратацию клетки, нарушают проводимость мембран для ионов и других молекул [8]. В этой связи можно полагать, что при традиционной технологии аквакультуры интенсивность СПОЛ приводит к повреждению структур оболочки икры и плазматической мембраны яйца, увеличению содержания  $Ca^{2+}$  в клетке и повышению активности  $Ca^{2+}$ -зависимых протеолитических и липолитических ферментов, и как следствие – активации СПОЛ. Доказательством повреждения липидного бислоя мембран в икре контрольной группы являются изменение  $Na^+/K^+$  гомеостаза, повышение гидратации икры и ее чрезмерное набухание (табл. 2) [7, 8].

Таблица 2

**Содержание биогенных катионов в икре карпа через 40 мин после оплодотворения**

Группа	Массовая доля, мг/кг		
	Кальций	Натрий	Калий
Опыт	57,2±6,32*	408±50,25	735±62,12
Контроль	105,8±21,43	505±38,16	924±73,33

Примечание: статистически достоверные различия между показателями контрольной и опытной групп (\* $p \leq 0,05$ ).

В последующие сроки наблюдения темпы дробления в опытной группе опережают контрольную группу (рис. 6) и закономерность более высоких темпов развития эмбрионов опытной группы сохраняется на протяжении всех исследуемых сроков исследования.

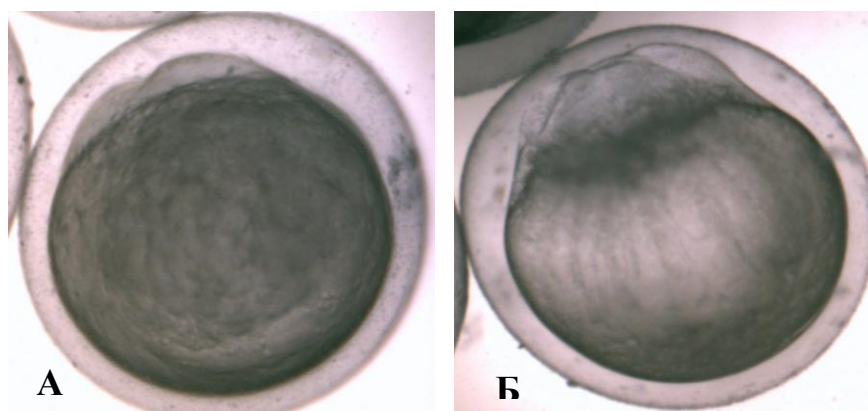


Рис. 6. Икра зеркального карпа через 1 ч после оплодотворения: А – контрольная группа; Б – опытная. Нативный препарат. Ув. 40 х.



Таким образом, использование серосодержащего антиоксиданта нового поколения «Тиофан» позволяет оптимизировать расход собственных антиоксидантных соединений, запасенных в яйце. Возможность их рационального использования должно обеспечить стабильность метаболических процессов, направленных на рост, развитие и дальнейший переход развития эмбрионов от гастрюляции к органогенезу. Полученные результаты позволяют считать, что антиоксидант «Тиофан» не является стимулятором роста, а лишь тонким инструментом настройки метаболических процессов. Использование разработанной технологии позволила увеличить выживаемость эмбрионов в опытной группе через 7 ч после оплодотворения на 12,87 % по сравнению с контролем.

### Литература

1. Дудкин С.И., Колесникова Л.В., Цема Н.И. Окислительный стресс и проблемы эмбриональной смертности ихтиофауны: неучтенный фактор ущерба естественному воспроизводству природных популяций в условиях хронического загрязнения водных экосистем // Мат-лы Междунар. науч. конф. – Ростов н/Д, 2004. – С. 49–51.
2. Лужин Б.Г. Зародышевое развитие карпа // Рыбоводство и рыболовство. – 1977. – № 2. – С. 11–12.
3. Макеева А.П. Эмбриология рыб. – М., 1992. – 216 с.
4. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. Окислительный стресс. – М., 2006. – 553 с.
5. Определение химических элементов в биологических средах и препаратах методами атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой: метод. указания. – М.: Федеральный центр Россанэпиднадзора Минздрава России, 2003. – 56 с.
6. Ромейс Б. Микроскопическая техника. – М.: Иностранная лит-ра, 1954. – 719 с.
7. Скулачев В.П. Эволюция, митохондрии и кислород // Соросовский образов. журн. – 1999. – № 9. – С. 1–7.
8. Скулачев В.П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода // Соросовский образов. журн. – 2001. – Т. 7. – № 6. – С. 4–10.
9. Стратегия развития аквакультуры в Российской Федерации на период до 2020 года. – М., 2007. URL: www.mscx.ru.
10. Черномашенцев А.И., Мильштейн В.В. Рыбоводство. – М., 1983. – 272 с.



УДК 579.2

С.В. Воробьева, С.В. Хижняк, Л.Т. Харламова

### ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА РОСТ ПСИХРОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПЕЩЕР ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА, СРЕДНЕЙ СИБИРИ И ЗАПАДНОГО КАВКАЗА

Статья посвящена сравнительному анализу температурных диапазонов роста психотропных бактерий, выделенных из пещер различных регионов бывшего СССР.

**Ключевые слова:** пещеры, микробные сообщества пещер, психрофильные и психротолерантные бактерии.

S.V. Vorobyeva, S.V. Hizhnyak, L.T. Kharlamova

### INFLUENCE OF TEMPERATURE ON GROWTH OF PSYCHROPHILIC BACTERIA ISOLATED FROM THE CAVES OF FAR EAST, MIDDLE SIBERIA AND WESTERN CAUCASUS

The article is devoted to the comparative analysis of temperature range of psychotropic bacteria growth isolated from the caves of former USSR different regions.

**Key words:** caves, cave microbial communities, psychrophilic and psychrotolerant bacteria.

В настоящее время в мире наблюдается растущий интерес к использованию психрофильных и психротолерантных микроорганизмов в биотехнологии [10,13–16,18]. Показано, что психрофильные и психротолерантные микроорганизмы представляют интерес с точки зрения защиты растений [20], биоремедиации почвы и водных объектов в условиях низких температур [11], поиска низкотемпературных ферментов для биотехнологических процессов [10,19].