

УДК 597.442:597.553.2:577.112:577.114:577.115:577.118

**БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИКОЙ
И ЗАВОДСКОЙ МОЛОДИ ОСЕННЕЙ КЕТЫ, КАЛУГИ И ОСЕТРА***Т.С. Крупина (Хабаровский госуниверситет)*

Изучение биохимических особенностей рыб на ранних этапах онтогенеза имеет большое значение, поскольку функциональные свойства взрослого организма определяются этими ранними этапами развития. В настоящее время к естественному воспроизводству многих видов рыб добавляется искусственное разведение их на рыбопроизводных заводах, где выращиваемая молодь подкармливается дополнительно, что, видимо, должно сказываться на изменении ее жизнеспособности и приспособляемости к условиям внешней среды.

О приспособляемости мальков к условиям внешней среды могут говорить многие биохимические показатели, определяющие их адаптационную пластичность. Большинство биохимических адаптаций, обеспечивающих нормальный жизненный процесс, сводится к определенным видам молекулярных механизмов: меняются типы макромолекул в той или иной части организма, их количество и концентрация или происходит адаптивная регуляция функций макромолекул.

Основной целью настоящей работы является оценка биохимических особенностей: 1) молоди осенней кеты в динамике и в различных условиях обитания, определяющих ее адаптационную пластичность; 2) молоди калуги в зависимости от характера кормления; 3) молоди осетра в зависимости от плотности посадки.

В данной работе разрешались следующие задачи:

провести широкое сравнительное изучение количественной изменчивости отдельных биохимических показателей мальков рыб: сухое вещество, зола, жир, азот, общий белок, гликоген печени, перекисное число жиров, хлориды жаберной жидкости;

исследовать количественное содержание ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав липидов (олеиновой, линолевой, линоленовой), и насыщенной (пальмитиновой);

изучить влияние некоторых кормов на характер изменения отдельных биохимических показателей молоди калуги в условиях искусственного воспроизводства на рыбопроизводных заводах Хабаровского края.

Материал и методики. Для биохимического анализа была взята дикая молодь осенней кеты, выловленная в районе Анюя в течение апреля – июня (30.04; 14.05; 26.05 и 07.06). Пробы дикой молоди осенней кеты от 26 мая и 7 июня характеризуют начало ската молоди и его активный период. Исследовали также заводскую молодь, взятую с Тепловского и Биджанского заводов 27.04.99.

Для сравнительного изучения биохимических показателей молоди калуги были взяты мальки из различных лотков, отличающихся характером кормления в течение июля – августа. В лотке №1 мальки получали только комбикорм в течение всего эксперимента, в лотке №4 — корм, состоящий из трубочника, в течение июля, а с 31 июля их корм включал добавки комбикорма. В лотке №7

мальки калуги в течение 2-х месяцев получали смешанный корм (трубочник и комбикорм).

В эксперимент были включены мальки осетра в возрасте 43 дней, выращиваемые в лотках №9 и 10, отличающихся плотностью посадки (от 5,5 до 3,5 тыс. экз/м²).

Комбикорма, использованные для кормления мальков калуги и осетра, были охарактеризованы как *стартовые* и *местные*.

Определение сухого вещества и золы. Сухое вещество в образцах мальков определяли гравиметрическим методом. Для этого навеску от 80 до 150 мг измельченных мышц мальков, взятых, в основном, со стороны спинной части, высушивали в сушильном шкафу при температуре 100–105 °С до постоянной массы, а затем сжигали в муфельной печи при температуре 400–500 °С до превращения ткани в светлую, иногда окрашенную золу. По разнице масс определяли в процентах массу сухого вещества (золы).

Определение азота и общего белка. Азот и общий белок определяли по методу Кьельдаля, основанному на деструкции органического вещества в присутствии медного купороса, сульфата калия и пероксида водорода. При этом азот органических соединений сразу освобождается в виде аммиака, улавливаемого титрованным раствором соляной кислоты. Содержание белка в биологическом препарате находили путем умножения процентного содержания азота в образце на коэффициент 6,25.

Определение гликогена. Для определения гликогена в печени брали навеску измельченной печени (около 50–100 мг), помещали ее в пробирку, добавляли 1 мл 30%-ного раствора КОН и 20 мин выдерживали на кипящей водяной бане. Горячие растворы охлаждали, разводили до объема 5 мл дистиллированной водой, добавляли 0,5 мл спиртового раствора дифениламина и нагревали на водяной бане в течение 10 мин. Пробы охлаждали и фотометрировали против холостой пробы при 600 нм на ФЭКе. Такую же цветную реакцию проводили с раствором глюкозы для построения калибровочной кривой. Для расчета содержания гликогена по калибровочному графику количество глюкозы делят на коэффициент 1,01, который отражает соотношение молярной массы глюкозы к молярной массе глюкозного остатка в гликогене.

Определение жира в теле мальков рыб. Для определения жира использовали метод, основанный на экстракции липидов ацетоном и смесью растворителей — эфира и этанола (1:1).

Навеску ткани рыб (0,2–0,4 г) измельчали, добавляли безводный Na₂SO₄ и хорошо растирали в ступке пестиком до однородной массы. Сухую массу из ступки ложкой переносили в колбу и заливали 2–3-кратным объемом смеси эфира с этанолом. После настаивания в течение суток раствор отфильтровывали через бумажный фильтр, остаток снова заливали смесью растворителей для полной экстракции. После испарения растворителя остаток взвешивали на аналитических весах и определяли содержание жира:

$$\text{Жирность, \%} = (\text{сухой остаток, г/навеска рыбы, г}) \cdot 100\%.$$

Определение перекисного числа жиров. Перекисное число (п.ч.) характеризует содержание в жире перекисных соединений, способных при определенных условиях выделять йод из подкисленного раствора йодистого калия. Для этого навеску жира массой 0,02–0,03 г растворяют в 10 мл смеси ледяной уксусной кислоты с дихлорэтаном (2:1). Затем в колбу вливают 1 мл насыщенного водного раствора йодистого калия. После этого колбу закрывают притертой пробкой и оставляют стоять в течение 20 мин в темном месте. Затем в колбу вливают 25 мл свежeproкипяченной и охлажденной воды, 1,5 мл 1%-ного раствора крахмала и оттитровывают выделившийся йод 0,002н раствором тиосульфата натрия (9Na₂S₂O₃).

В таких же условиях ставили контрольный опыт. Раствор Na₂S₂O₃ готовили из фиксанала. Перекисное число определяли по формуле

$$\text{п.ч.} = (a_1 - a) \cdot 0,02538/A,$$

где a_1 и a — количество 0,002н раствора тиосульфата, израсходованного на титрование йода в опытах с навеской жира (a_1) и контрольным (a); A — навеска исследуемого жира.

Определение хлоридов. Количественное определение хлоридов проводили по методу Мора, основанному на осаждении хлора титрованным раствором азотнокислого серебра в присутствии индикатора — хромата калия (K_2CrO_4). Хромат калия вступает в реакцию с серебром после осаждения всего хлора и образует с серебром осадок кирпично-красного цвета. Количество $AgNO_3$, пошедшее при титровании на образование осадка $AgCl$, эквивалентно количеству хлора.

Для определения ионов хлора отмеривают в колбу 1 мл жаберной жидкости, добавляют 5 мл воды и 2–3 капли 5% -ного раствора K_2CrO_4 в качестве индикатора. Титруют 0,01н раствором $AgNO_3$, причем в начале выпадает белый осадок, титруют далее до образования осадка кирпично-красного цвета. Для расчета количества хлорида результат титрования умножают на 0,355 (количество миллиграммов хлора, соответствующее 0,1 мл 0,01н раствора $AgNO_3$).

Определение жирных кислот. Для определения жирных кислот использовали метод тонкослойной хроматографии на силуфоле. Образец жира гидролизуют в спиртовом растворе щелочи в течение 1 ч при температуре 100 °С, затем нейтрализовали и хроматографировали в системе растворителей: бензол-этилацетат (5:4). В качестве стандартных свидетелей использовали растворы пальмитиновой, олеиновой, линоленовой и линолевой кислот известных концентраций.

Результаты. Характеристика дикой молодежи осенней кеты. Динамика основных биохимических показателей дикой молодежи осенней кеты представлена в табл. 1; из нее видно, что количественное содержание многих химических веществ у дикой молодежи Анюя изменяется незначительно, видимо, потому, что наблюдения за ней велись в пределах полутора месяцев, т.е. с 27.04 до 07.06.99.

Сухое вещество у молодежи осенней кеты, как показывают результаты, находится на уровне от 20,2 до 21,3%; содержание золы — 2,0–2,2%. Небольшие колебания этих показателей можно отнести за счет индивидуальных и возрастных изменений, а также — разницы в условиях обитания.

Динамика жира у дикой молодежи осенней кеты положительна до начала ската, т.е. количество жира в мышечной ткани мальков возрастает с 2,66 до 3,71%, а в период активного ската начинает несколько снижаться.

Динамика высших жирных кислот хорошо коррелирует с динамикой жира и перекисного числа у диких мальков осенней кеты. Как видно из табл. 1, количество непредельных жирных кислот в жирах мальков возрастает с 2,84 до 3,6 мг/мл, а количество пальмитиновой кислоты снижается с 2,52 до 1,96%, т.е. происходит увеличение суммы непредельных кислот и уменьшение количества предельных кислот (около 20–23%).

Активное появление длинноцепочечных непредельных кислот группы C18 в жирах мальков явно свидетельствует об их подготовленности к смене условий обитания.

Характер изменения перекисного числа в жирах мальков также положителен, увеличение его составляет около 10%. Увеличение перекисного числа жиров за данный период времени у мальков осенней кеты свидетельствует об изменении структуры жиров, связанной с синтезом непредельных кислот. Биосинтез в жирах мальков линолевой и линоленовой непредельных кислот также говорит о том, что у мальков осенней кеты в данный период возможно исключение жировой недостаточности, а отсюда — и различных патологических изменений (например, инфекция плавников). Т.е. исследуемые нами биохимические показатели могут служить индикаторами физиологического состояния молодежи осенней кеты.

Сумма всех непредельных кислот у диких мальков возрастает за исследуемый период примерно на 1,0 мг/мл, а количество пальмитиновой кислоты уменьшается на 0,5 мг/мл до ската. Затем оно стабилизируется и составляет 1,96 мг/мл с начала ската. Следовательно, в связи со скатом у мальков осенней кеты идет перестройка жиров, связанная с увеличением общего количества

Таблица 1

Биохимические показатели у молоди осенней кеты (лето 1999 г.)

Объект исследований, водоем	Дата	Сухое вещество, %	Зола, %	Жир, %	Перекисное число	Гликоген печени, %	Азот, %	Общий белок, %	Cl ⁻ , мг-экв/л	Органические кислоты, мг/мл				пальмитиновая
										олеиновая	линолевая	линоленовая	общая сумма ненасыщенных кислот	
Молодь заводской осенней кеты	27.04	20,09	2,19	2,85	1,68	2,14	1,44	9,00	114,80	1,04	0,92	0,30	2,26	2,26
	27.04	18,03	1,90	2,78	1,46	2,28	1,62	10,12	118,01	1,33	0,88	0,36	2,57	2,48
Молодь дикая	30.04	20,18	1,94	2,66	1,30	2,31	1,67	10,43	116,26	1,53	0,93	0,38	2,84	2,52
	14.05	21,14	2,01	3,05	1,35	2,42	1,71	10,69	118,29	1,62	1,09	0,42	3,13	2,18
Ануй, скат	26.05	21,28	2,22	3,71	1,40	2,46	1,70	10,62	122,40	1,64	1,11	0,52	3,27	1,96
	07.06	21,33	2,20	3,68	1,44	2,38	1,66	10,37	127,85	1,72	1,25	0,63	3,60	1,96

непредельных кислот и уменьшением количества предельных кислот. Таким образом, путем увеличения или уменьшения степени насыщенности жирных кислот у мальков осуществляется адаптация к изменению среды (температуры, солености, экологии и пр.), позволяющая им существовать в пределах ареала.

Азот и общий белок у диких мальков осенней кеты изменяются незначительно. Количество азота составляет от 1,6 до 1,7%, а количество белка — 10,0–10,5%. Эти незначительные белковые изменения связаны, видимо, только с ростом мальков в естественных условиях обитания.

Гликоген печени у диких мальков за исследуемый период изменяется также незначительно, в пределах 2,3–2,4%, поскольку он является наиболее специфической формой аккумуляции энергии, используемой для производства кратковременной неэнергоёмкой работы. Эти данные хорошо согласуются с данными, полученными нами при изучении дикой и озерной молоди в 1988–1991 гг., у той и другой содержание гликогена в течение месяца практически не менялось и находилось на уровне 2,46–2,58%.

Содержание ионов хлора Cl^- в жаберной жидкости характеризует подготовку дикой молоди к скату и начало ската, т.е. идет подготовка к переходу из пресной воды с меньшим осмотическим давлением в соленую воду со значительно большим осмотическим давлением. Но этот переход еще не прошел, а потому колебания в содержании ионов хлора пока незначительны. Эти незначительные колебания в содержании ионов хлора в жаберной жидкости говорят о том, что мальки находились примерно в одинаковых условиях (речная вода), осмотическое давление в клетках примерно одно и то же, поэтому и концентрация хлоридных клеток очень близка — 116–120 мг-экв/л. Ионы хлора являются наиболее важными осмотическими ионами жаберной жидкости, что и позволяет малькам воспринимать извне и отдавать во внешнюю среду ряд веществ, обеспечивая возможность нормального осуществления клетками их физиологических функций.

Характеристика заводской молоди осенней кеты. Заводская молодь осенней кеты была взята на анализ с Тепловского и Биджанского заводов в конце апреля 1999 г. (см. табл. 1). Сравнивая эту молодь, можно видеть некоторые различия в биохимических показателях, а именно, у молоди Биджанского завода при практически одинаковом содержании жира, предельных и непредельных кислот, перекисное число намного меньше, чем в жирах мальков Тепловского завода.

Более высокое перекисное число жиров у мальков Тепловского завода говорит о том, что условия обитания здесь менее благоприятны, чем у мальков Биджанского завода (более высокая температура воды, экологические факторы и пр.). Другие биохимические показатели — белок, азот, гликоген печени, изменяются незначительно [Сидоров, 1987; Шульман, 1967]. Количество ионов хлора в жаберной жидкости у этих мальков примерно одинаковое (114–118 мг-экв/л) и соответствует практически их содержанию у дикой молоди в данный период онтогенеза.

Биохимический анализ осетровых рыб, выращиваемых на искусственных кормах. Данные биохимического исследования мальков калуги и осетра представлены в табл. 2. При смешанном кормлении мальков в лотке №7 наблюдается довольно равномерное повышение основных биохимических показателей: количество белка составляет 9,5%, гликогена печени — 2,7%, жира — 3,75%. Перекисное число за исследуемый период изменяется незначительно, видимо, экспериментальный период невелик, и потому количество непредельных кислот меняется незначительно.

При кормлении мальков калуги только комбикормом нами замечено значительное увеличение жиров (до 4,6%), гликогена печени (до 2,94%). Общий белок мальков этой пробы повышен (10,2%), но незначительно по сравнению с белком контрольной пробы (лоток №7).

Перекисное число жиров у мальков, получающих только сухой корм, изменяется также незначительно, что может говорить о нормальном жизненном тоне этих мальков. В жирах наблюдаются небольшое увеличение пальмитиновой

Таблица 2

Динамика биохимических показателей мальков калуги и осетра (лето 1999 г.)

Объект исследований, условия содержания	Дата	Сухое вещество, %	Зола, %	Общий белок, %	Жир, %	П. ч.	Гликоген, %	Cl ⁻ , мг-экв/л	Органические кислоты, мг/мл	
									пальмитиновая	олеиновая
Лоток №1 (кормление комбикормом)	31.07	20,11	1,86	10,11	4,01	1,45	2,861	134	2,56	1,04
	10.08	20,09	1,98	10,25	4,63	1,55	2,94	137	2,62	1,28
Лоток №4 (кормление тубочником и с 31.07 — тубочником с комбикормом)	31.07	21,31	1,76	8,65	3,91	1,95	2,30	131	2,01	1,01
	10.08	20,86	1,88	9,01	3,62	1,65	2,45	133	2,22	1,29
Лоток №7 (кормление тубочником и комбикормом)	31.07	19,83	1,85	9,55	3,55	1,60	2,62	141	2,41	1,30
	10.08	20,31	1,92	9,68	3,95	1,68	2,71	139	2,59	1,38
Лоток №9 (плотность посадки 5,5 тыс.экз/м ³)	6.07	20,55	2,01	9,01	3,50	1,61	2,91	121	3,01	1,29
	6.07	20,76	2,22	11,24	4,08	1,24	4,06	126	2,18	1,11

кислоты (в пределах 3%) и увеличение в этих же пределах количества олеиновой кислоты. Содержание ионов хлора во всех исследуемых пробах независимо от кормления остается примерно одинаковым — на уровне 130–140 мг-экв/л, что свидетельствует о том, что возраст мальков одинаков и одинакова среда обитания, т.е. пресная вода.

Несколько по-другому выглядят биохимические показатели у мальков, получавших только корм из трубочника до 01.08.99. Эта группа мальков до 31.07.99 отличалась низкими показателями содержания жира (3,91%), гликогена в печени (2,3%), а также общего белка (8,65%). В жирах мальков этой группы наблюдается большое количество перекисных соединений, хотя непредельных кислот еще немного (до 2,01 мг/мл).

С дополнительным введением в пищу мальков комбикорма динамика биохимических показателей несколько изменилась в сторону небольшого уменьшения жира (с 3,91 до 3,62%); содержание гликогена немного увеличилось (от 2,3 до 2,45%) наряду со снижением перекисного числа и увеличением количества олеиновой кислоты до примерно той же величины, что у мальков из лотка №7, т.е. контроля.

Таким образом, дополнительное введение в корм мальков калуги наряду с трубочником комбикорма несколько изменило жизненный статус мальков в сторону увеличения основных биохимических показателей: жира, гликогена, непредельных кислот, понижения перекисного числа жиров. Такие изменения в биохимических показателях мальков калуги могут, видимо, свидетельствовать о том, что кормление только трубочником явно недостаточно для растущих мальков калуги.

Биохимический анализ мальков осетра в возрасте 43 дней, выращенных при разной плотности посадки, показал, что уплотнение посадки приводит к изменению биохимического состояния рыб, связанного с увеличением перекисного числа жиров с 1,24 до 1,61 наряду с преобладанием насыщенной пальмитиновой кислоты до 3,01 мг/мл, уменьшением количества гликогена в печени с 4,06 до 2,91%. Значительные отклонения биохимических показателей этой группы молоди осетра могут свидетельствовать о вариациях условий среды обитания мальков, воздействии стрессовых факторов (в данном случае — плотности посадки мальков). Преобладание в жирах мальков осетра при плотности посадки в 5,5 тыс. экз/м² пальмитиновой кислоты (более 3 мг/мл) при одновременно низком содержании олеиновой кислоты (до 1,29 мг/мл) и увеличении перекисного числа до 1,61 ед. может привести в дальнейшем к снижению темпов роста мальков или снижению их жизнестойкости.

Характеристика кормов. На анализ был взят корм для молоди осенней кеты, калуги и осетра — стартовый корм и комбикорм (стартовый корм и различные добавки). Корм был проанализирован только на содержание жира и белка (табл. 3).

Таблица 3
Содержание жира и белка в кормах рыб

Вид корма	Жир, %	Белок, %	Перекисное число
Стартовый корм	8,01	30	Не обнаружено
Комбикорм	8,82	32	То же

По литературным данным, содержание липидов в кормах варьирует у разных видов рыб и составляет до 15–18% в стартовых кормах. Содержание жира в кормах меняется в соответствии с их потребностью. В теплой воде потребность в жирах у рыб возрастает по сравнению с таковой в холодной воде. С другой стороны, не все липидные соединения значимы для рыб.

З а к л ю ч е н и е . Основные биохимические показатели дикой молоди осенней кеты (содержание золы, сухого вещества, белка, азота, жира, гликогена печени) имеют тенденцию к увеличению до скатывания, а отношение перекисного числа на единицу жира хорошо согласуется с динамикой непредельных кислот. У заводской молоди осенней кеты Тепловского завода отмечено небольшое содержание жира наряду с высоким накоплением перекисных соединений в нем при одновременном уменьшении общего количества белка и гликогена печени по сравнению с таковым у дикой молоди такого же возраста. Молодь

осенней кеты Тепловского рыбопроизводного завода значительно отличается от дикой по составу жира:

общей суммой непредельных жирных кислот (2,26 и 2,84 мг/л соответственно);

значительно меньшим содержанием олеиновой кислоты (1,04 и 1,53 мг/л соответственно);

меньшим содержанием линоленовой кислоты (0,30 против 0,38 мг/л) при практически одинаковом содержании линолевой кислоты (0,92 и 0,93 мг/л соответственно);

меньшим количеством пальмитиновой кислоты (2,26 и 2,52 мг/мл соответственно).

Молодь осенней кеты Биджанского рыбопроизводного завода значительно ближе к дикой молоди как по общему содержанию азота, общего белка, гликогена, жира (2,78 и 2,66 мг/л соответственно), так и отдельных видов высших жирных кислот в нем, а также по общей сумме ненасыщенных жирных кислот (2,57 и 2,84 мг/л) и содержанию пальмитиновой кислоты (2,48 и 2,52 мг/л соответственно). Перекисное число несколько повышено (1,46 против 1,30).

При изучении биохимических характеристик молоди калуги установлено следующее:

кормление мальков смешанным кормом приводит к увеличению количества жира, общего белка и гликогена печени, перекисное число жиров остается практически неизменным;

при кормлении мальков только комбикормом увеличение основных биохимических показателей незначительно за исследуемый период;

кормление мальков только трубочником приводит к уменьшению изученных биохимических показателей, что, вероятно, может влиять на их жизненный тонус.

Увеличение плотности посадки мальков осетра снижает содержание общего белка и увеличивает перекисное число жиров как показатель окислительных процессов в организме.

Содержание жира в стартовом корме обнаружено в количестве 8%, белка — до 30%; в комбикорме — около 9 и 32% соответственно. Перекисное число в кормах не обнаружено.