

УДК:597-118+597-1.05

ОЦЕНКА СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТИ ЛЕЩА *ABRAMIS BRAMA* ПО ОБМЕНУ ИОНАМИ НАТРИЯ И КАЛИЯ МЕЖДУ ОРГАНИЗМОМ И ВОДОЙ

© 2008 г. Р.А. Запруднова

Институт биологии внутренних вод РАН, п. Борок Ярославской области 152742

Поступила в редакцию 22.06.2007 г.

Окончательный вариант получен 03.10.2007 г.

Предлагается метод прижизненной диагностики стрессоустойчивости рыб (на примере леща) в искусственной и естественной среде обитания по обмену ионами в ограниченном объеме воды сниженной минерализации, предпочтительнее того же ионного состава, что в природных водоемах. Впервые разделение устойчивых и неустойчивых к стрессу рыб рекомендуется проводить по натриевому и калиевому обмену, а по калиевому – определять также индивидуальную устойчивость среди стрессоустойчивых особей. Показана связь между величиной ионного дисбаланса при стрессе и продолжительностью жизни рыб.

ВВЕДЕНИЕ

Для внутривидового разделения представителей высших наземных животных по стрессоустойчивости применяется метод «открытое поле», где различия определяются по характеру двигательной активности. Показана связь поведенческой реакции с биохимическими параметрами: содержанием катехоламинов в мозге и активностью Na-K-АТФазы в эритроцитах млекопитающих (Симонов, 1992; Маслова, 1994). В связи с тем, что в жизни рыб, как водных животных, роль ионов особенно велика, настоящим исследованием предлагается метод диагностики стрессоустойчивости на основании обмена ионами натрия и калия между организмом и водой у особей, содержащихся в небольшом объеме воды сниженной минерализации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служил половозрелый лещ (*Abramis brama*) Рыбинского водохранилища в возрасте 9-11 лет. Определение возраста проводили по чешуе (Правдин, 1966). Перед опытом рыбы адаптировались от 2 нед. до 3 мес. в лабораторных условиях в отстоянной грунтовой (водопроводной) воде при соотношении массы тела и воды 1:150-300. Концентрация ионов натрия, калия, кальция и магния в воде составляла, соответственно, 0,42-0,56, 0,04-0,1, 2,1-2,5 и 0,83-1 ммоль/л, что примерно в 5 раз превышало таковую в воде водохранилища. Перед опытом лещей взвешивали и выдерживали 1-2 мин. в воде того ионного состава, в котором проводили исследование: дистиллированной (n=9), дистиллированной с добавлением ионов кальция (n=4) и разбавленной в 5 раз водопроводной воде (n=8). Последняя по ионному составу соответствовала воде в открытых водоемах. Каждую особь помещали в отдельный аквариум, где вода принудительно аэрировалась. Соотношение между массой тела рыбы и объемом воды составляло 1:20. Опыты проводили летом при 17-20 °С, что соответствовало естественному ходу температур воды в водоеме и лабораторных аквариумах. Использовались голодающие рыбы. Обмен ионов между организмом и водой во всех опытах изучали до момента гибели рыб, продолжительность жизни служила контрольным показателем стрессоустойчивости. Концентрацию ионов натрия и калия в пробах определяли на приборе Flapho-4 в воздушно-пропановом пламени, кальция и магния – на AAS-1 – в воздушно-ацетиленовом.

На рисунке изображены лишь основные экспериментальные точки, обязательно лежащие на изломе кривых, однако пробы воды анализировались значительно чаще. При отсутствии или очень малых изменениях в ионном обмене ежедневно исследовали по 2-3 пробы, однако в первые и последние 1-2 дня опыта, а также в любое другое время при резком изменении ионного обмена (усилении потерь и/или усилении абсорбции) анализировали в сутки до 20 проб и более. В работе анализировали суммарную потерю (поглощение) – измеряемую по количеству потерянного или поглощенного иона единицей массы тела за период наблюдения – называемую еще чистым потоком («netflux») и концентрацию ионного баланса (или установившееся в процессе исследования равновесие потерь и поглощения ионов), означающую минимальную концентрацию иона в среде, при которой организм может поддерживать свою жизнеспособность (Виноградов, 1987, 2000). Соотношение между концентрацией ионного баланса и величиной ионных потерь, представленной на рисунке, определялось соотношением между массой тела рыбы и объемом воды. Кроме того, вычисляли скорость потери ионов. Результаты обрабатывались статистически. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ответ на помещение рыб в небольшой объем воды сниженной минерализации первоначально наблюдали усиление диффузии ионов натрия и в меньшей степени – калия в воду. По величине этих потерь и по характеру ионного обмена между организмом и водой, устанавливавшемуся в ходе опыта, проводили разделение рыб по стрессоустойчивости.

Уже в первые 3-5 часов исследования можно выделить крайних по стрессоустойчивости особей, у которых величина диффузии натрия и/или калия различалась в 10-50 раз. Например, в изначально дистиллированной воде самые неустойчивые к стрессу рыбы: 7 (диагностировались по самым большим потерям натрия), 8,9 (по самым большим потерям калия) и самые устойчивые особи 1 и 2 (определяли по самой низкой диффузии калия) (рис. IА, Б) и в разбавленной водопроводной воде, соответственно 5,6 (неустойчивые) и 1,2 (устойчивые) – диагностировали по потерям натрия и калия (рис. IIА, Б).

Продолжительность диагностики всех неустойчивых к стрессу рыб не превышала одних суток и осуществлялась по высоким значениям скорости потери ионов натрия и концентрации ионного баланса. При этом в воде разного ионного состава эти показатели были одинаковыми или близкими по величине. Так скорость потери ионов в изначально дистиллированной и разбавленной в 5 раз водопроводной воде колебалась в пределах 0,37-0,58 ммоль/кг·ч, а в дистиллированной воде с добавлением ионов кальция составляла в среднем 0,4 ммоль/кг·ч (рис. А I, II, III). Концентрация ионного баланса по натрию у стрессонеустойчивых особей, содержащихся в воде различной минерализации, к концу первых суток опыта приближалась к 0,3-0,4 ммоль/л. У рыб в изначально дистиллированной и разбавленной водопроводной воде через 2-3 суток наблюдали дальнейшее увеличение потерь ионов, достигающее к моменту гибели, соответственно, 9-13 и 8-11 ммоль/кг. Однако у лещей, содержащихся в дистиллированной воде с ионами кальция, удерживалось равновесие процессов диффузии и абсорбции ионов, поэтому смерть рыб через 4-5 сут. наступала практически при том же уровне потерь натрия, что и в конце первых суток исследования, т.е. при 4-6 ммоль/кг. Таким образом, относительная независимость величины первоначальных ионных потерь от минерализации и ионного состава воды у неустойчивых к стрессу особей

существенно облегчает процесс их диагностики. Продолжительность жизни неустойчивых рыб в воде различной минерализации также была практически одинаковой и различалась не более, чем на 0,5-1,5 суток.

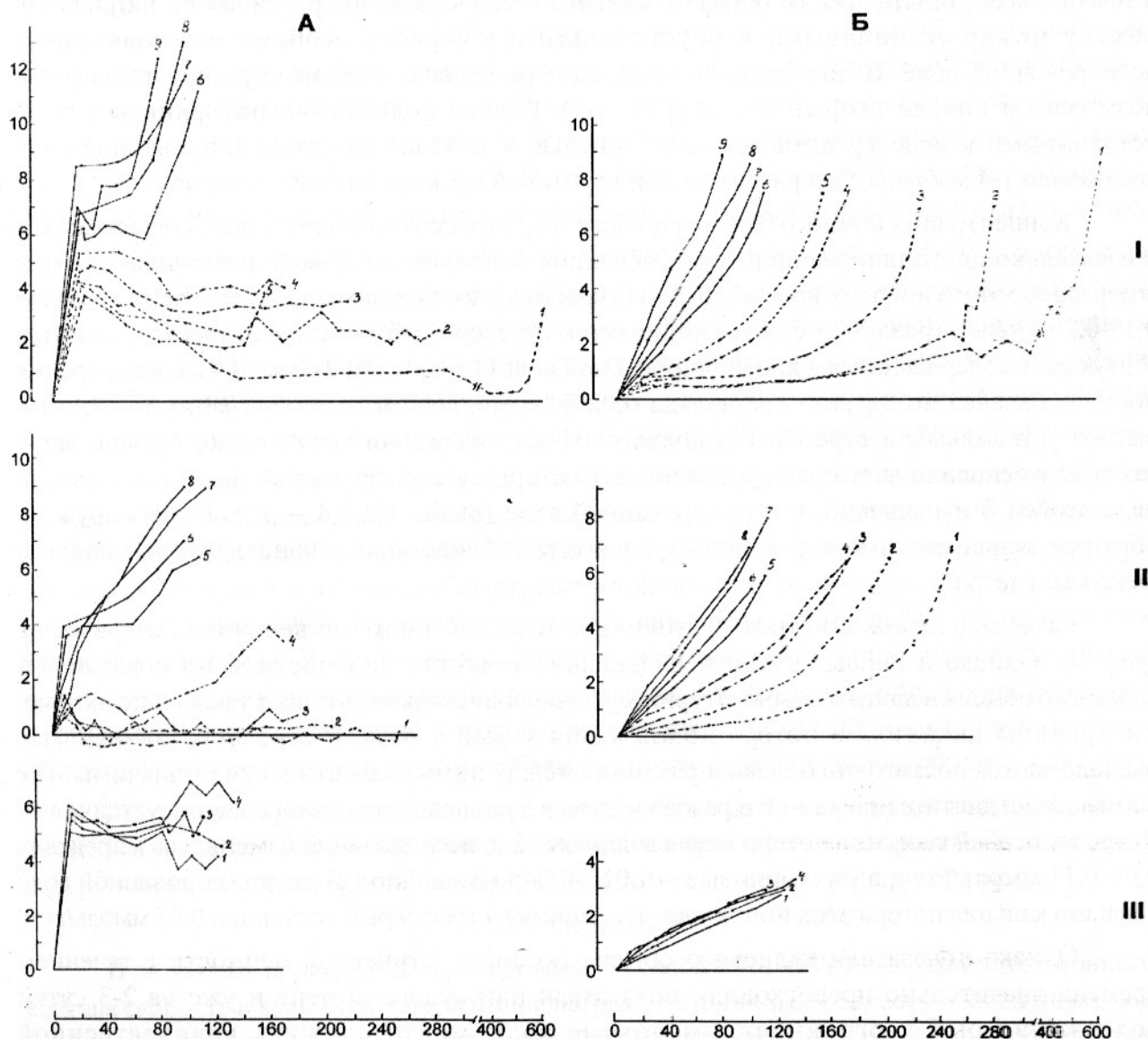


Рис. Обмен ионами натрия (А) и калия (Б) у леща между организмом и водой при стрессе.

I, II и III – соответственно, изначально дистиллированная вода, разбавленная в 5 раз водопроводная и изначально дистиллированная с добавлением ионов кальция в концентрации 2,5 ммоль/л.

По оси ординат – потери ионов в воду, ммоль/кг; по оси абсцисс – время жизни рыб, ч.

1-9 – номера рыб; сплошной линией – неустойчивые к стрессу рыбы, пунктирной – устойчивые.

Fig. The exchange of sodium and potassium ions between an organism and water in stress.

I, II and III – initially distilled water, five times dilluted soil water and initially distilled water with addition of 2,5 mmol/l calcium ions, correspondingly;

Ordinate axis – ions loss in water, mmol/kg; abscissa axis – life duration of fish, h.

1-9 – fish numbers; solid line – fish unresistent to stress, dotted line – fish resistant to stress.

Однако у устойчивых к стрессу рыб скорость потери ионов натрия зависела от минерализации воды. Так в изначально дистиллированной воде в первые 12 ч. исследования

особей в разбавленной водопроводной воде возможна уже через 10-12 ч. опыта (рис. ПА). Столь низкие потери ионов в разбавленной водопроводной воде свидетельствуют об относительном постоянстве концентрации ионов во внешней среде на первоначальном уровне в течение всего опыта. Таким образом, сильнее всего выражены различия по натриевому обмену между устойчивыми и неустойчивыми к стрессу особями в разбавленной водопроводной воде. В дистиллированной воде разделение рыб по стрессоустойчивости возможно в начале вторых суток (рис. IА). Общее количество потерянных ионов устойчивыми к стрессу рыбами перед гибелью в изначально дистиллированной воде составляло 1-4 ммоль/кг, а в разбавленной грунтовой практически равно нулю.

Концентрация ионного баланса по натрию у стрессоустойчивых рыб, содержащихся в изначально дистиллированной и разбавленной водопроводной воде равна или близка к содержанию этого иона в открытых пресных водоемах: в основном она колебалась в пределах 0,15-0,2 ммоль/л (различия с неустойчивыми к стрессу особями статистически значимы). У двух рыб, содержащихся в дистиллированной воде (1 и отчасти 2 – рис. IА), концентрация ионного баланса по натрию составляла 0,02-0,1 ммоль/л. Этих особей можно отнести к высоко устойчивым к стрессу. Продолжительность их жизни значительно превосходила таковую у основной части рыб, устойчивость которых к стрессу можно назвать средней. У ряда особей в изначально дистиллированной воде (рыбы 1,2,3,4 – рис. IА) обнаружена обратная зависимость между индивидуальной устойчивостью и концентрацией ионного баланса по натрию.

Разделять лещей по стрессоустойчивости можно также по величине потерь калия (рис. Б). Однако в первые сутки исследования точность диагностики по показателям калиевого обмена в данных температурных условиях несколько уступает таковой по натрию, т.к. границы диапазонов потерь ионов калия у рыб с разной стрессоустойчивостью располагаются достаточно близко и различия между ними статистически не значимы. Так в изначально дистиллированной и разбавленной в 5 раз водопроводной воде у неустойчивых к стрессу особей скорость потери калия в первые 12 ч. исследования изменялась в пределах 0,06-0,11 ммоль/кг·ч., а у устойчивых – 0,012-0,045 ммоль/кг·ч. В дистиллированной воде с ионами кальция потери этих ионов у неустойчивых к стрессу рыб составили 0,05 ммоль/кг·ч.

Однако показатели калиевого обмена по диагностической ценности с течением времени значительно превосходили показатели натриевого обмена и уже на 2-3 сутки содержания рыб в ограниченном объеме воды могли служить количественной характеристикой степени стрессоустойчивости каждой особи в связи с большой индивидуальной вариабельностью величины потерь ионов калия среди стрессоустойчивых рыб. Скорость диффузии ионов калия связана обратной зависимостью со стрессоустойчивостью. В начале вторых суток исследования у устойчивых к стрессу рыб этот показатель не превышал 0,02 ммоль/кг·ч. У рыб со средней устойчивостью превышение этого уровня потерь начинается в конце вторых – начале шестых суток. Однако у высокоустойчивых к стрессу рыб (или мало чувствительных) низкие потери ионов калия в воду (0,01- 0,02 ммоль/кг·ч.) держатся длительный период времени: 8-10 сут. и более (рис. IБ). Кроме того, у рыб 1 и 2 в изначально дистиллированной воде с 1 по 4 сутки опыта регистрировали фазы равновесия абсорбции и диффузии. А на 10-11-12-13 сутки у этих рыб наблюдалось преобладание абсорбции ионов калия над потерями: за одни сутки

(рис. 1Б). Кроме того, у рыб 1 и 2 в изначально дистиллированной воде с 1 по 4 сутки опыта регистрировали фазы равновесия абсорбции и диффузии. А на 10-11-12-13 сутки у этих рыб наблюдалось преобладание абсорбции ионов калия над потерями: за одни сутки регистрировали поглощение от 0,25 до 0,4 ммоль на кг веса тела (во всех случаях суточные изменения статистически значимы). Скорость потери ионов калия у рыб с различной стрессоустойчивостью, нарастая в ходе опыта, достигала наибольших значений перед гибелью: в изначально дистиллированной и разбавленной водопроводной воде обычно колебалась в диапазоне 0,15-0,20 ммоль/кг·ч., иногда непродолжительный период времени (в течение получаса-часа) она увеличивалась в 10-40 раз. Характер кривой потерь калия напоминал экспоненту. В растворе хлористого кальция диффузия ионов калия примерно в два раза ниже.

Концентрация ионного баланса по калию у высокоустойчивых к стрессу рыб составляла 0,02-0,03 ммоль/л. Этот показатель у среднеустойчивых к стрессу рыб находился в диапазоне 0,05-0,1 ммоль/л (различия с высокоустойчивыми достоверны). У неустойчивых к стрессу особей сложно определить величину концентрации ионного баланса, т.к. они теряли ионы калия практически непрерывно и с высокой скоростью. Однако иногда наблюдали непродолжительную стабилизацию в ионном обмене на уровне ионов в воде 0,25 ммоль/л.

Общее количество потерянных ионов калия в изначально дистиллированной и разбавленной водопроводной воде перед гибелью у всех исследуемых рыб (включая и неустойчивых к стрессу) составляло 7-9 ммоль/кг. Однако это количество рыбы теряли за различный период в зависимости от стрессоустойчивости: от 2-4 сут. до 1 мес. и более (рис. Б; Запруднова, 2005). В растворе хлористого кальция величина диффузии ионов калия примерно вдвое ниже. У устойчивых к стрессу особей основные потери калия происходили ближе к их гибели и могли наблюдаться периоды преобладания абсорбции этих ионов над диффузией. К числу показателей высокой стрессоустойчивости рыб помимо низких потерь и низкого уровня концентрации ионного баланса относится усиление абсорбции ионов калия.

Результаты проведенных исследований указывают на существование обратной зависимости между величиной ионного дисбаланса при стрессе (скоростью и величиной потерь, концентрацией ионного баланса) и продолжительностью жизни рыб (рис).

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что в воде различного ионного состава скорость и величина потери ионов натрия у устойчивых к стрессу особей ниже, чем у неустойчивых более чем в 2-10 раз. У устойчивых к стрессу также ниже скорость потери калия, которая со временем может служить показателем индивидуальной устойчивости. Для рыб с высокой стрессоустойчивостью характерно эпизодическое преобладание абсорбции ионов калия над диффузией. Концентрация ионного баланса по натрию и калию между стрессонеустойчивыми и высокоустойчивыми к стрессу рыбами различалась в среднем на порядок, а между средне- и высокоустойчивыми – в 2-5 раз. Для отделения устойчивых к стрессу от неустойчивых предлагаемым способом требуется не более одних-двух суток.

При оценке стрессоустойчивости рыб нельзя ориентироваться только на абсолютные значения ионных потерь и концентрации ионного баланса, которые зависят от ионного состава, солености, температуры воды, возраста рыб, их тренированности, сезона года и др. Хотя перечисленные факторы не могут служить помехой для разделения рыб по стрессоустойчивости, все же необходимо принимать во внимание их влияние на ионный обмен.

Влияние солености и ионного состава воды. Важным условием разделения рыб по стрессоустойчивости предлагаемым способом является использование воды низкой минерализации, по крайней мере, не выше, чем в открытых пресных водоемах. Применение слабоминерализованной воды создает условия для усиления ионной диффузии, интенсивность которой и служит основным показателем стрессоустойчивости. В настоящей работе также установлено, что в слабоминерализованной воде (до уровня минерализации в открытых пресных водоемах) различия в стрессоустойчивости выражены сильнее и выявляются быстрее, чем в изначально дистиллированной.

У рыб, помещенных в ограниченный объем неразбавленной водопроводной воды (к которой рыбы были предварительно адаптированы в лаборатории), наблюдалось усиление абсорбции натрия. При этом величина абсорбции натрия и потерь калия связана обратной зависимостью со стрессоустойчивостью рыб (Запруднова, 2007).

Необходимо учитывать особенности ионного обмена у рыб, содержащихся в дистиллированной воде с добавлением ионов кальция, состоящие примерно в двукратном снижении величины потерь ионов натрия и калия. Это показано в наших опытах на леще (рис. III) и ранее другими авторами на карасе, карпе, окуне (Виноградов, 1987, 2000). Роль экзогенного кальция в организации ультраструктуры жабр у пресноводных рыб, снижении проницаемости жаберного эпителия и повышении его адгезивных характеристик подробно описана в работе В.Е. Матей (1996). Г.А. Виноградов (1987) предложил прижизненно оценивать реакцию рыб на стрессорное воздействие по величине общей потери ионов натрия в растворах хлорида кальция 50-150 мг/л. Это единственная работа, обнаруженная нами, где для диагностики состояния рыб при стрессе предлагаются показатели ионного обмена, а не внутренней среды организма. Однако автор, в отличие от нас, исследовал лишь самые первые фазы стрессового воздействия и не применял в диагностике показатели калиевого обмена. На наш взгляд, при определении стрессоустойчивости рыб предпочтительнее использовать не раствор хлорида кальция, а воду с соленостью и ионным составом, совпадающими или близкими к таковым в естественной среде обитания исследуемых рыб. Кроме того, это удобно в экспедиционных условиях.

Влияние температуры. В жизни рыб как пойкилотермных животных роль температуры особенно велика. Большое влияние оказывает температура и на показатели ионного обмена (Запруднова, 1999а, 2000, 2005). С понижением температуры происходит замедление ионо-транспортных процессов и уменьшение потерь калия. Так общее количество потерянных перед гибелью ионов калия у устойчивых к стрессу рыб уменьшалось при низких сублетальных температурах в 1,3-1,7 раз по сравнению со средней областью температурной толерантности. При низких температурах также происходит ослабление абсорбции натрия и повышение концентрации ионного баланса. Поэтому при низких температурах возрастала диагностическая ценность калиевого обмена и снижалась – натриевого, особенно в первые двое суток опыта. При повышении температуры наблюдаются противоположно направленные процессы: ускорение ионного обмена, повышение потерь калия и натрия и усиление абсорбции натрия. Самая большая диффузия ионов натрия выявлена на границах диапазона температурной толерантности, а самая высокая концентрация ионного баланса (до 0,3 ммоль/л у устойчивых к стрессу) % в низких предлетальных температурах. Кроме того, с повышением температуры адаптации

уменьшалась средняя продолжительность жизни рыб. Несмотря на то, что температура оказывала влияние на ионный обмен рыб, основные принципы их разделения по стрессоустойчивости при различных температурах одинаковы. Это более высокая скорость потерь ионов натрия и калия у неустойчивых в сравнении с устойчивыми, способность последних нормализовать натриевый обмен на уровне, близком к таковому в естественной среде, но также зависящему от температуры. Кроме того, для особей, высокоустойчивых к стрессу, характерно усиление абсорбции ионов калия. Однако его нельзя обнаружить при высоких температурах, которые в сочетании с небольшим объемом воды являются сильной стрессовой нагрузкой. Хотя диагностику стрессоустойчивости рыб по показателям ионного обмена можно проводить на протяжении всего диапазона температурной толерантности, но предпочтительнее использовать диапазон 10-20 °С. Этот диапазон находится в пределах естественного колебания температур в течение полугода в естественной среде обитания (в период навигации), и круглый год может поддерживаться в лабораторных условиях без использования терморегулирующих устройств. Однако необходимо учитывать различия в скорости ионных потоков у рыб в пределах указанного температурного диапазона: так этот показатель и, следовательно, время диагностики в 10 и 20 °С отличались не менее чем в 1,5 раза. За границами диапазона 10-20 °С в более низких температурах процесс исследования растягивается на длительный период, а высокие (предлетальные) температуры значительно ограничивают диагностические возможности метода из-за переизбытка стрессовой нагрузки. В верхних предлетальных температурах устойчивые к стрессу особи реагируют по типу неустойчивых.

Влияние возраста. Одним из важнейших принципов, который должен соблюдаться при диагностике состояния рыб по показателям ионного обмена является сравнение между собой близких по возрасту особей, а на ранних этапах онтогенеза (особенно у сеголеток) к тому же и близких по массе тела. Потери ионов в воду уменьшаются по мере старения рыб. На разных видах рыб установлено, что скорость диффузии у сеголеток превышает таковую у взрослых особей в десятки раз (Виноградов, 1987, 2000; Запруднова, 2001а). Однако, как было показано ранее (Запруднова, 2001а) на поздних стадиях онтогенеза возрастные различия в ионном обмене существенно уменьшаются, это позволяет сравнивать по стрессоустойчивости особей, отличающихся на 2-3 года. Снижение потерь ионов в ходе онтогенеза (т.е. при увеличении массы тела), вероятно, связано с уменьшением удельной поверхности тела и жабр (Яржомбек и др., 1986).

Диагностика стрессоустойчивости рыб по показателям ионного обмена требует применения *достаточно сильной нагрузки*. В настоящей работе эта проблема решалась использованием небольших объемов воды для содержания рыбы, где главными стрессовыми факторами являлись ограничение подвижности и уменьшенная концентрация кислорода. При соотношении массы тела и воды 1:20 содержание кислорода в воде (в условиях постоянной аэрации) в среднем снижено на 2 мг/л от 100%-ного насыщения, что при 17-20 °С примерно составляло 6 мг/л. Показателем напряженности дыхательных процессов является высокое (более 100 ммоль/л) содержание калия в эритроцитах. Подбор оптимального соотношения массы тела и воды должен проводиться с учетом влияния других стрессовых факторов (например, высокой температуры, деминерализации воды и др.), чтобы не допустить их передозировки. Недостаток стрессового воздействия,

возможный, например, зимой при низких температурах и/или в условиях достаточно больших объемов минерализованной воды, может быть компенсирован дополнительными воздействиями типа механического, шумового и светового раздражения. Например, для карася, рыбы пугливой, живущей в стоячих водоемах, очень сильным стрессором служила высокой интенсивности принудительная аэрация воды. Возможно применение неудобной формы аквариума (узкого и высокого), в котором рыба находится в полусогнутом состоянии: это позволяет увеличивать объемы воды в два и более раз в сравнении с применяемым для леща в наших опытах.

Необходимо также учитывать *функциональное состояние* исследуемых рыб. Например, свежепойманные рыбы обладают большей чувствительностью к любого рода стрессовым воздействиям, и в начальный период нагрузки активные и пассивные ионотранспортные процессы у них выражены значительно сильнее, чем у адаптированных (Мартемьянов, 1985). Г.А. Виноградовым (1987, 2000) установлено, что обмен калия в значительной степени зависит от физиологического состояния рыб. Автор разделил адаптированных в лабораторных условиях рыб по обмену калия на 3 группы. У особей первой группы потери калия значительно превышают поглощение, у рыб второй группы потери примерно равны поглощению, в третьей группе поглощение существенно выше потерь. Обнаружены также и промежуточные варианты. На наш взгляд, результаты исследований этого автора, выполненные в единых методических условиях, можно рассматривать и как результаты диагностики стрессоустойчивости рыб по показателям калиевого обмена.

Установлены также отличия в скорости потерь ионов, между представителями *различных видов рыб*. Как правило, диффузия ионов выше у менее устойчивых к стрессу и/или у эволюционно более древних видов рыб (Эль-Гарабавей, 1986; Виноградов, 1987, 2000). Однако основные принципы разделения рыб по стрессоустойчивости одинаковы в пределах каждого вида. Это подтвердили проведенные нами исследования на половозрелых особях плотвы (*Rutilus rutilus*) и щуки (*Esox lucius*) Рыбинского водохранилища и двухлетках искусственно разводимого карася (*Carassius auratus*) по аналогичной схеме, что у леща, но в течение 1-2 сут. В этот период у устойчивых к стрессу особей всех видов рыб баланс натрия в воде такого же состава, что в водохранилище, практически не менялся.

О *сезонных особенностях* ионного обмена известно мало. Отмечается, в частности, что зимой потери ионов в одинаковых условиях ниже, чем летом, а в преднерестовый период усиливается абсорбция натрия из воды (Запруднава, 2003; Романенко, 1994). На наш взгляд, определение стрессоустойчивости по ионному обмену можно проводить в любое время года. Однако в период размножения (когда рыба находится в состоянии естественного напряжения) в качестве основного диагностического показателя должны служить потери ионов калия, т.к. непродолжительный период времени активный транспорт ионов натрия из воды может быть выражен сильнее у особей с меньшей устойчивостью к стрессу, чем у более устойчивых.

Таким образом, проведенный анализ выявил зависимость абсолютных значений показателей ионного обмена у рыб от целого ряда факторов: солености, ионного состава, температуры, объема воды, возраста рыб, сезона года и др. Получить представление о возможном диапазоне колебаний показателей ионного обмена в конкретных условиях и на конкретном объекте можно непосредственно в процессе диагностики. Однако лучше сделать

это заранее, и заранее произвести подбор оптимальной нагрузки для эффективного разделения рыб по стрессоустойчивости. В дальнейшем, можно ограничиться исследованием малого количества проб воды, например, 1-2 в сутки. Влияние различных факторов не препятствует разделению рыб по стрессоустойчивости, т.к. основные принципы диагностики одинаковы во всех условиях: выделение стрессоустойчивых рыб проводится по способности нормализовать натриевый обмен на уровне концентрации этого иона в природной воде (и ниже) и по меньшим потерям натрия и калия в начале опыта, а дальнейшее определение индивидуальной устойчивости среди устойчивых к стрессу проводится по характеру калиевого обмена. Усиление абсорбции ионов калия, предлагаемое нами как один из показателей высокой стрессоустойчивости, зависит от исходного функционального состояния (устойчивости) и от силы стрессового воздействия. В менее жестких экспериментальных условиях усиление активного транспорта ионов калия выявляется у большей части среднеустойчивых особей, но никогда – у неустойчивых. При сильных нагрузках способность к абсорбции можно обнаружить лишь у высокоустойчивых к стрессу особей через достаточно продолжительный срок адаптации.

Контрольный показатель – продолжительность жизни рыб – прямо связан с устойчивостью к стрессу. По мере снижения стрессоустойчивости снижалась продолжительность жизни и увеличивался ионный дисбаланс. По величине нарушения в системе водно-солевого равновесия и продолжительности жизни состояние исследуемых рыб – высокоустойчивых, среднеустойчивых и неустойчивых к стрессу – можно отнести, соответственно, к хроническому, подострому и острому стрессу с летальным исходом (Запруднова, 2001б, 2003).

Можно указать лишь на единичное число литературных источников, где ионные параметры для диагностики состояния рыб применяются не случайно и не однократно. Однако и они не содержат фундаментальных методических разработок оценки стрессоустойчивости рыб, а, главным образом, лишь указывают на существование связи между состоянием рыб и изменениями ионных параметров. К тому же все они за исключением выше указанной работы Г.А. Виноградова (1987) ориентированы на показатели внутренней среды. Так состояние рыб предлагается определять после солевых нагрузок по динамике концентрации натрия в плазме крови (Clarke, Blackburn, 1977; Reading et al., 1987), по уровню хлоридов и калия (Wedemeyer, McLeady, 1981; Schreck, 1990), по изменению содержания кальция в плазме крови в различных стрессовых условиях (Иэнзи, 1990; Мартемьянов, 1998). Кроме того, установлено влияние на активные и пассивные ионные потоки в эритроциты в опытах *in vitro* различных токсических соединений в экспериментальных и природных условиях (Котелевцев и др., 1991). Встречаются немногочисленные исследования ионного состава тканей рыб в полевых условиях, главным образом, больных миопатией осетровых (Кузьмина и др., 1992; Мартемьянов, 1994; Наточин и др., 1995).

Диагностика стрессоустойчивости рыб с использованием показателей ионного обмена превосходит информативностью и простотой методы оценки состояния рыб по параметрам внутренней среды. Диапазоны колебания содержания ионов калия и натрия в плазме крови у взрослого леща, совместимые с жизнью, составляют соответственно 0,5(0,2)-6(8) и 90-142(151) ммоль/л. При этом самые большие (относящиеся к крайним значениям указанных диапазонов), но непродолжительные во времени изменения в системе водно-солевого

равновесия отмечаются при сильном остром обратимом стрессе. Однако гибель рыб при хроническом стрессе наблюдается при значительно более узком диапазоне концентрации ионов калия и натрия в плазме крови, соответственно: 2-5 и 115-128 ммоль/л (Мартемьянов, Запруднова, 1982; Запруднова, 1991, 1999б, 2000, 2001а, 2001б). Поэтому при диагностике состояния рыб по показателям внутренней среды необходимо учитывать не только величину отклонения ионных показателей от нормы, но и устойчивость во времени этих изменений. Прижизненное взятие проб крови от рыб требует от исследователя высокого уровня профессионализма, к тому же всегда сохраняется вероятность травматических эффектов и изменения состояния животных во время этой процедуры. Кроме того, пробы тканей рыб в отличие от воды перед анализом их на ионный состав на приборе нуждаются в предварительной обработке. Гормональные и иммунологические показатели внутренней среды у рыб также не являются достаточно надежными показателями стрессоустойчивости (Pottinger et al., 1994; Запруднова, Прозоровская, 1999).

В связи с проблемой внутривидовых различий в стрессоустойчивости всегда будет потребность в простых и эффективных прижизненных способах ее определения. Исследования распространенным методом «открытое поле» при визуальном наблюдении сопровождаются немалыми физическими и временными затратами, либо нуждаются в сложной (нередко громоздкой) аппаратуре, неприменимой в экспедиционных условиях. Однако наличие стационарного прибора (пламенного фотометра) в лаборатории решает проблему исследования ионного обмена рыб в экспедициях, т.к. концентрация натрия и калия в пробах воды сохраняется неизменной практически неограниченное время и не зависит от температуры. Кроме того, одновременное изучение ионного обмена и поведения рыб в небольшом объеме воды обнаружило у неустойчивых к стрессу рыб (т.е. обладающих большими потерями ионов) как повышенную, так и пониженную двигательную активность (Запруднова, 1999б). Все сказанное позволяет считать метод диагностики по ионному обмену приоритетным в отношении водных животных.

На основании проведенных исследований предлагается следующая схема исследования рыб на стрессоустойчивость при температуре 16-19 °С (15-20 °С) в лабораторных условиях. В начале рабочего дня каждая рыба помещается в небольшой объем воды (соотношение массы тела и воды для взрослых рыб различных видов 1:20-1:50) с принудительной аэрацией. Лучше использовать воду из мест обитания рыб в открытых пресных водоемах. Но возможно применение до соответствующего уровня разбавленной грунтовой (водопроводной) воды. В этих условиях у неустойчивых к стрессу особей выявляются непрерывные потери ионов натрия в воду. У устойчивых к стрессу рыб на протяжении 7-9 ч. (т.е. рабочего дня) и в дальнейшем концентрация натрия в окружающей их воде поддерживается неизменной, либо возможны редкие, небольшие и кратковременные потери этих ионов, вскоре сменяющиеся усилением их абсорбции. Величина диффузии ионов калия, связанная обратной зависимостью со стрессоустойчивостью, служит дополнительным индикатором состояния рыб. Если существует потребность в определении индивидуальной устойчивости среди стрессоустойчивых особей, то исследования с ними продолжаются и диагностика осуществляется, главным образом, по калиевому обмену. В течение последующих 1,5-3 сут. и более у высокоустойчивых рыб величина потерь ионов калия сохраняется на крайне низком, почти неизменном уровне. Однако в это время усиливается

диффузия ионов у среднеустойчивых к стрессу рыб, при этом наиболее значительно – у наименее устойчивых среди них. В результате диапазон ионных потерь у одних и тех же особей за период наблюдения с 1,5 до 3 сут. увеличивается более чем в 1,5 раза, что существенно расширяет возможности диагностики. Так если в первые 1,5 сут. могли возникать затруднения с определением индивидуальной стрессоустойчивости у 20-30% особей из всех исследуемых стрессоустойчивых рыб, то через 3 сут. диагностируются практически все рыбы. Дополнительным показателем высокой стрессоустойчивости может служить преобладание абсорбции ионов калия над потерями, выявляемое в жестких экспериментальных условиях не ранее чем через 10 сут. Хотя основная роль в определении индивидуальной стрессоустойчивости среди устойчивых к стрессу принадлежит калиевому обмену, натриевый обмен служит дополнительным индикатором состояния рыб. Показателем неблагополучия может служить не только усиление потерь натрия. Увеличение абсорбции этих ионов, сопровождающееся особенно сильными потерями калия указывает на близкую гибель рыб.

Рыбы, исследуемые сразу после отлова из естественной среды обитания, как уже указывалось, более чувствительны к стрессовым воздействиям, поэтому в небольшом объеме воды даже у устойчивых к стрессу рыб будут наблюдаться потери ионов натрия в воду. Однако через 1-3 ч. они сменяются преобладанием абсорбции этих ионов и в дальнейшем (через 4-7 ч.) устанавливается равновесие диффузии и активного транспорта ионов натрия (концентрация ионного баланса) на более низком уровне, чем в природной среде. Дальнейшие этапы исследования рыб на стрессоустойчивость в экспедиционных условиях аналогичны описанному выше для лабораторных животных. В случае необходимости количество взятых на анализ проб воды можно сократить до 1-2 в сутки.

Предлагаемый метод разделения рыб по стрессоустойчивости может быть рекомендован к использованию для корректной постановки опытов в лабораторных условиях. Известно, например, что у пресноводных рыб при остром и хроническом стрессе, вызываемом разными факторами, коэффициент вариации по многим ионным параметрам возрастал в 2-3 и более раз (Мартемьянов, Запруднова, 1982; Запруднова, 1991, 1999а, 1999б; Запруднова, Прозоровская, 1999). Существует также настоятельная потребность в определении стрессоустойчивости рыб в рыбоводных хозяйствах, особенно это относится к ценным производителям и особям, подвергаемым сильным стрессовым воздействиям типа транспортировки, зимовки в неблагоприятных условиях. Разработка новых способов диагностики состояния рыб в природе актуальна в связи с ростом антропогенной нагрузки на водоемы и возникновением в них напряженных стрессовых ситуаций. Как правило, индивидуальная вариабельность различных показателей у рыб в местах повышенного загрязнения сначала повышается (Исюмов, Запруднова, 1982; Запруднова, 2001в; Васильев и др., 2004), а затем снижается (Сметанин, Шихова, 2000), вероятно, в связи с элиминацией стрессонеустойчивых особей. Из-за отсутствия фенотипической адаптации к ксенобиотикам (Флеров, 1989) выявление генотипически устойчивых рыб особенно важно в тех случаях, когда применяемые методы борьбы с загрязнениями оказываются малоэффективными, либо вообще не действенными.

ВЫВОДЫ

1. Предлагается метод разделения пресноводных рыб (на примере леща) по устойчивости к стрессу в естественной и искусственной среде обитания по показателям ионного обмена в небольшом объеме воды сниженной минерализации, предпочтительнее такого же ионного состава, что в природном водоеме.

2. Главным отличием рыб устойчивых от неустойчивых к стрессу является способность первых поддерживать натриевый баланс на уровне равном или более низком, чем концентрация натрия в открытых пресных водоемах. У устойчивых к стрессу особей также меньше скорость и величина потери ионов натрия и калия. Время диагностики в природной воде (или воде такого же ионного состава) не превышает полусуток.

3. Определение индивидуальной устойчивости среди стрессоустойчивых рыб проводится по калиевому обмену. Время диагностики от 1,5 до 3 сут. Скорость диффузии ионов калия и концентрация ионного баланса связаны обратной зависимостью со стрессоустойчивостью. К показателям высокой устойчивости относится также преобладание абсорбции этих ионов над потерями.

4. Точность диагностики по показателям ионного обмена, в особенности калиевого, возрастает со временем.

5. Показано уменьшение ионных потерь в дистиллированной воде, содержащей ионы кальция.

6. Установлена обратная зависимость между величиной ионного дисбаланса при стрессе и продолжительностью жизни рыб.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 06-04-48282).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Васильев А.С., Запруднова Р.А., Буйневич А.В. Мониторинг состояния популяций леща верхневолжских водохранилищ. Сб. Экологические проблемы уникальных природных и антропогенных ландшафтов. Ярославль: ЯрГУ, 2004. С. 207-212.

Виноградов Г.А. Процессы ионной регуляции у пресноводных рыб и беспозвоночных. Экологические и эволюционные аспекты: Авт. дисс. д.б.н. Л.: Зоол. ин-т АН СССР, 1987. 39с.

Виноградов Г.А. Процессы ионной регуляции у пресноводных рыб и беспозвоночных. М.: Наука, 2000. 216с.

Виноградов Г.А., Борисовская Е.В., Лапиров А.Г. Особенности обмена ионов кальция и магния у некоторых водных растений различных систематических групп // Жур. общ. биол. 2000. Т. 61. №2. С. 163-172.

Запруднова Р.А. Концентрация ионов в плазме крови и мышцах у пресноводных рыб перед гибелью // Вопросы ихтиологии. 1991. Т. 31. №3. С. 520-524.

Запруднова Р.А. Влияние температуры акклимации на содержание одновалентных катионов в плазме крови, эритроцитах и мышцах у леща *Abramis brama* // Вопросы ихтиологии. 1999а. Т. 39. №3. С. 410-415.

Запруднова Р.А. Изменения поведения и ионной регуляции у пресноводных рыб при стрессе // Успехи соврем. биол. 1999б. Т. 119. №3. С. 265-270.

Запруднова Р.А. Температурные адаптации у леща: изменения в поведении и ионорегуляции. Тез. докл. IX Всеросс. конф. Экологич. физиол. и биохим. рыб. Ярославль, 2000. Т. 1. С. 109-112.

- Запруднова Р.А. Возрастные изменения ионной регуляции у леща *Abramis brama* при стрессе // Вопросы рыболовства. Приложение 1. 2001а. С. 79-81.
- Запруднова Р.А. Стресс у пресноводных рыб: вопросы ионной регуляции. Сб. Проблемы экологии, биологии, экологического образования, химии. Ярославль: ЯрГУ, 2001б. С. 248-250.
- Запруднова Р.А. Многолетний мониторинг ионной регуляции леща в бассейне Волги. Сб. Тез. докл. XI междунар. симпоз. «Современные проблемы биоиндикации и биомониторинга». Сыктывкар, 2001в. С. 64.
- Запруднова Р.А. Обмен и регуляция катионов у пресноводных рыб при стрессе: Автореф. дис. к.б.н. Борок: ИБВВ, 2003. 23 с.
- Запруднова Р.А. Поведение и ионная регуляция у пресноводных рыб в низких сублетальных температурах. Сб. Поведение рыб. М.: АКВАРОС, 2005. С. 158-162.
- Запруднова Р.А. Контроль состояния пресноводных рыб по ионному составу воды. Сб. Мат. междунар. научно-практ. конф. «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов-2». М.: Россельхозакадемия, 2007. С. 168-172.
- Запруднова Р.А., Прозоровская М.П. Изменение содержания катехоламинов и ионов в тканях у леща *Abramis brama* при стрессе // Вопросы ихтиологии. 1999. Т. 39. №2. С. 247-252.
- Изюмов Ю.Г., Запруднова Р.А. Изменчивость морфологических и биохимических признаков леща волжских водохранилищ. Сб. Тез. докл. V Всес. конф. экол. физиол. биохим. рыб. Севастополь. Киев: Наукова думка, 1982. Ч. 4. С.11.
- Йэнзи Ж. Влияние стрессорных факторов рыбоводства на некоторые физиолого-биохимические показатели карпа: Автор. дисс. к.б.н. М.: МГУ, 1990. 24 с.
- Котелевцев С.В., Скрябин Г.А., Ребров В.Г., Рязский Г.П., Орлов С.Н. Влияние 3-метилхолантрена и совола на транспорт одновалентных ионов в эритроцитах карпа *Cyprinus carpio* // Ж. эвол. биох. и физиол. 1991. Т. 27. №3. С. 295-299.
- Кузьмина О.Ю., Лукьяненко В.И. и др. Особенности водносолевого гомеостаза у осетровых при расслоении мышечной ткани // Вопросы ихтиологии. 1992. Т. 32. Вып. 4. С. 138-143.
- Мартемьянов В.И. Чувствительность рыб к воздействиям в естественных и лабораторных условиях // Вопросы ихтиологии. 1985. Т. 25. №6. С. 1042-1044
- Мартемьянов В.И. Содержание катионов в плазме, эритроцитах и мышцах леща *Abramis brama*, отловленного в различных участках Рыбинского водохранилища // Вопросы ихтиологии. 1994. Т. 34. №5. С. 727-731.
- Мартемьянов В.И. Сезонная динамика содержания кальция в плазме, эритроцитах, мышцах и гонадах плотвы *Rutilus rutilus* // Биология внутренних вод. 1998. №2. С. 73-79.
- Мартемьянов В.И., Запруднова Р.А. Динамика концентрации электролитов в плазме крови, эритроцитах и мышечной ткани пресноводных рыб при стрессе // Биол. науки. 1982. №10. С. 44-49.
- Маслова М.И. Активность мембранных ферментов эритроцитов при различных стрессорных воздействиях // Физиол. ж. 1994. Т. 80. №7. С. 76-80.
- Матей В.Е. Жабы пресноводных костистых рыб. С.-Пб.: Наука, 1996. 204 с.
- Наточин Ю.В., Лукьяненко В.И., Шахматова Е.И., Лаврова Е.А., Металлов Г.Ф. Двадцатилетний мониторинг (70-90-е годы) физико-химических параметров сыворотки крови у русского осетра *Acipenser guelden staedti* // Вопросы ихтиологии. 1995. Т. 35. №2. С. 253-257.
- Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб. М.: Пищевая промышленность, 1966. 376 с.

- Романенко В.Д. Метаболизм калия у пресноводных рыб // Гидробиол. ж. 1994. Т. 30. №3. С. 63-69.
- Симонов П.В. Стресс как индикатор индивидуально-типологических различий // Патолог. физиол. и эксперим. терапия. 1992. №4. С. 83-85.
- Сметанин М.М., Шихова Н.М. О линейном росте леща на отдельных участках верхневолжских водохранилищ // Биол. внутр. вод. 2000. С. 138-141.
- Флеров Б.А. Эколого-физиологические аспекты токсикологии пресноводных животных. Л.: Наука, 1989. 144 с.
- Эль-Гарабавей М.М. Эколого-физиологическое значение химических сигналов хищных рыб как стрессоров для мирных карповых: Автореф. дис. к.б.н. М.: МГУ, 1986. 24 с.
- Яржомбек А.А., Лиманский В.В., Щербина Т.В., Бекина Е.М., Лысенко П.В. Справочник по физиологии рыб. М.: Агропромиздат, 1986. 192 с.
- Clarke W.C., Blackburn J. A seawater challenge test to measure smolting of juvenile salmon // Can. Fish. and Mar. Serv., Res. and Devel. Direc. Techn. Report. 1977. P. 705.
- Pottinger T.G., Moran T.A., Morgan J.A.W. Primary and secondary indices of stress in the progeny of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high and low responsiveness to stress // J. Fish Biol. 1994. V. 44. Pp. 149-163.
- Redding J.M., Schreck C.B., Everest F.M. Physiological effects on coho salmon and steelhead of exposure to suspended solids // Trans. Amer. Fish. Soc. 1987. V. 116. Pp. 737-744.
- Schreck C.B. Physiological, behavioural and performance indicators of stress. In: Amer. Fish. Soc. Symp. 1990. Pp. 29-37.
- Wedemeyer G.A., McLeay D.J. Methods for Determining the Tolerance of Fishes to Environmental Stressors. In: Stress and Fish. (ed. Pickering). L., N-Y, Toronto.: Acad. Pres. 1981. Pp. 247-275.

APPRAISE OF STRESSSTABILITY OF BREAM BY EXCHANGE OF SODIUM AND POTASSIUM IONS BETWEEN AN ORGANISM AND WATER

© 2008 y. R.A. Zaprudnova

*Institute of biology of inland waters of the Russian Academy of Science
(IBIW RAS), Borok of Yaroslavl range*

The method of lifetime diagnostics of fish stress resistance (for example bream) in artificial and natural habitats by ion exchange in the limited volume of low mineralized water is suggested. For the first time the separation of fish resistant and not resistant to stress is recommended to make by sodium and potassium exchange, to determine individual resistance between fish resistant – by potassium exchange.