

ТЕХНОЛОГІЇ В АКВАКУЛЬТУРІ

УДК: 597.443:621.59

ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ РЕАЛІЗАЦІЇ СКЛАДОВИХ ЕТАПІВ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ СПЕРМИ СТРУМКОВОЇ ФОРЕЛІ (*SALMO TRUTTA MORFA FARIO LINNE*)

В. Ю. Філіпов, v.y.filipov@gmail.com, Інститут рибного господарства НААН, м. Київ
А. І. Мрук, amruk@ukr.net, Інститут рибного господарства НААН, м. Київ
Л. П. Драган, dragan_l@ukr.net, Інститут рибного господарства НААН, м. Київ
Л. Л. Галоян, terteryan2009@mail.ru, Інститут рибного господарства НААН, м. Київ
Л. П. Бучацький, irido1@bigmir.net, Інститут рибного господарства НААН, м. Київ

Мета. Провести апробацію розробленого дегідратаційно-вітрифікаційного методу на спермі струмкової форелі з орієнтовною оцінкою складових частин та етапів процесу кріоконсервації біооб'єкта: температурної адаптації, підбору кріоконсерванта, режиму заморожування-відтавання, способу кріоконсервації в цілому.

Методика. Розроблений та опрацьовується дегідратаційно-вітрифікаційний метод заморожування сперми різних видів риб. Збір та опрацювання даних здійснювали за загальноприйнятими в рибництві методиками. Підготовку та розбавлення сперми криозахисним середовищем виконували згідно з затвердженими інструкціями.

Результати. Досліджено можливість кріоконсервації сперми струмкової форелі за допомогою розробленого дегідратаційно-вітрифікаційного методу. Визначено умови кріоконсервації біооб'єкта, середовища, кріоконсерванти та режими заморожування-відтавання. Проаналізовано вплив технологічних етапів процесу кріоконсервування сперми струмкової форелі на зниження показників збереженості (S) і ефективності (W). Збереженість розморожених статевих клітин струмкової форелі за початкової активності нативних сперматозоїдів 90% становила 25%.

Наукова новизна. Вперше отримано достовірний результат з кріоконсервації сперми струмкової форелі за допомогою розробленого дегідратаційно-вітрифікаційного методу.

Практична значимість. Показано досить позитивний ефект застосування розробленого методу та підібраних режимів кріоконсервації сперми струмкової форелі.

Ключові слова: кріоконсервація, струмкова форель, сперма, збереженість.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ ТА АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

В Україні практикуються різні способи низькотемпературної консервації сперми риб. В залежності від низки технологічних параметрів самого процесу кріоконсервації, виду риб, приладного забезпечення, фізіологічного стану плідників, об'єктів риборозведення та особливостей їх підготовки до відбору статевих продуктів, фізико-хімічного режиму водного середовища під час підготовчого утримання риб, а також під впливом інших чинників, можуть обумовлювати істотні відмінності показників збереженості деконсервованого біологічного матеріалу.

Серед загальноприйнятих методів низькотемпературного заморожування використовуються ті, що включають еквілібрацію біооб'єкта з кріопротектором, вибір складу криозахисних середовищ, оптимізацію фізико-хімічних характеристик заморожування та удосконалення апаратного забезпечення



процесу кріоконсервації, жоден не дозволяє одержати деконсервовані клітини з повністю відновленими морфо-функціональними характеристиками. Це цілком відноситься і до статевих клітин, які після проведення циклу заморожування-відтавання під дією фізичних та біохімічних чинників частково втрачає запліднювальну здатність [1]. За допомогою розробленого дегідратаційно-вітрифікаційного методу заморожування сперми різних видів риб, була проведена апробація кріоконсервації на спермі струмкової форелі.

Форель струмкова – *Salmo trutta morfa fario* Linne – нативний вид, який мешкає в гірських ріках Карпатського регіону. Оксифільна та реофільна риба, віддає перевагу мілководним річкам та струмкам зі стрімкою течією. Статева зрілість настає, зазвичай, в три–чотирирічному віці. Нерест у риб осінньо-зимовий (жовтень–грудень). Струмкова форель – цінна риба, тривалість життєвого циклу – до 12 років. Довжина тіла статевозрілих особин складає 25,0–37,5 см, маса 0,2–0,8 кг, зрідка до 2 кг [2, 3].

ВИДІЛЕННЯ НЕВИРШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ. МЕТА РОБОТИ

Негативний антропогенний вплив на природно-екологічні комплекси в другій половині 20-го століття та в сучасний період (зміна гідрологічного, хімічного, біологічного режимів, спричинена гідротехнічним будівництвом, сплавом лісу, неконтрольованим видобутком гравію, забрудненням води господарськими та побутовими стоками, побутовим сміттям, надмірний вилов риб) порушив типові біотопи, в результаті чого втрачена можливість природного відтворення місцевих популяцій струмкової форелі та реофільних риб загалом. Останній пункт на теперішній час набуває рівня екологічного лиха. Нині струмкова форель є рідкісним видом в гірських річках України.

Підсумовуючи вищесказане, очевидна необхідність проведення термінових заходів з відтворення струмкової форелі для відновлення та поповнення природних популяцій [4, 5] з використанням розробленого дегідратаційно-вітрифікаційного методу заморожування сперми різних видів риб.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проводили на базі ставового господарства «Фактор» Закарпатської лабораторії лососівництва та відтворення рідкісних і зникаючих видів риб Інституту рибного господарства НААН й індустріального господарства «Ішхан».

Підготовку та розбавлення сперми підібраним кріозахисним середовищем виконували згідно загальних інструкцій [6, 7] з модифікаціями. Одержані еякуляти охолоджували до 5°C. До охолоджених еякулятів за безперервного перемішування додавали охолоджене до тієї ж температури захисне середовище в об'ємному співвідношенні 1:1. Розбавлені у ньому охолоджені еякуляти еквілібрували в холодильнику за температури 5°C впродовж 0,5 год. Спермодози розфасовували в пластикові контейнери (пробірки) місткістю 2 мл, які герметизували і переносили на лід. Після закінчення процесу формування спермодоз пробірки протирали насухо і встановлювали в диск заморожувача.

Реєстрацію зміни температури зразків біооб'єкта проводили хромель-копелевою термопарою за допомогою мультиметра EC890G фірми MAXTECH з точністю до 0,2°C. Застосовували метод пасивного охолодження термоблоку в



горловині Дьюара [1, 8]. Програма заморожування біоб'єкта полягала в двох послідовних етапах. Перший – в температурному діапазоні від 5°C до -15°C з швидкістю охолодження 2–3°C/хв.. Другий – зі зниженням температури від -15°C до -70°C, швидкість охолодження зростала до 15–20°C/хв, після чого пробірки з біоб'єктом повільно занурювали в рідкий азот. Відтавання контейнерів із замороженим біоб'єктом проводили у водяній бані (40°C). Для активації розмороженої сперми використовували ставову воду. Збереженість сперматозоїдів перевіряли в кожній пробі не менше трьох разів і обчислювали середні значення.

Оцінку рухливості активованих у воді сперматозоїдів на різних технологічних етапах проводили за допомогою візуального методу з використанням оптичної апаратури зі збільшенням біоб'єкта в 20 разів [1, 6–9].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На підставі аналізу одержаних результатів двоступінчастого заморожування сперми різних видів риб була проведена апробація розробленого способу кріоконсервації на спермі струмкової форелі.

Аналіз численних літературних даних і наші власні результати [1, 6, 9] показують, що існуючі способи кріоконсервування сперми одного виду не можуть бути прямо перенесені на сперму іншого виду риб. Тому, перш ніж розпочати кріоконсервування сперми струмкової форелі, необхідно заздалегідь підібрати середовище і режими на дослідних зразках (табл. 1).

Таблиця 1. Деякі морфометричні характеристики струмкової форелі, яка використовувалася в дослідях

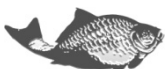
Показники	№1 ♂	№2 ♂	№3 ♂	№4 ♂	№5 ♂
Маса риби, г	157	283	343	214	98
Довжина риби за Смітом, см	24	29	30	28	21
Найбільша висота тіла, мм	65	75	80	60	50
Найменша висота тіла, мм	20	25	30	25	18

У зв'язку з цим, проведено методичний підбір параметрів кріоконсервації: режими заморожування-відтавання (швидкість, кінцева температура), склад кріоконсерванта (концентрація, вид і кількість кріопротекторів, склад середовища). У процесі підбору кріопротектора використовували етиленгліколь, диметилсульфоксид та ячний жовток. Сперма від самців струмкової форелі була отримана без гормональної стимуляції. Вона вільно витікала за легкого масажу черевця в напрямку від грудної частини до генітального отвору (табл. 2).

Таблиця 2. Показники, що характеризують сперму плідників струмкової форелі

№ ♂	Об'єм еякуляту, мл	pH сперми	Осмотичний тиск плазми, мОсмол/кг	Частка рухливих сперматозоїдів у воді, %	Період активного руху сперматозоїдів, с
1	3,5	8,15	40	90	40
2	5,1	8,24	35	90	31
3	8.0	8,19	32	90	27
4	6,7	8,20	38	90	19
5	4,2	8,18	36	90	25

Температура води під час проведення робіт, з одержання статевих продуктів



від самців струмкової форелі, була в межах 8°C.

Вміст розчиненого у воді кисню перебував на рівні 9 мг/дм³. Водневий показник (рН) води становив 7,6. Тобто, умови середовища в процесі проведення рибницьких робіт були сприятливими для ефективного дозрівання статевих продуктів плідників струмкової форелі.

Максимальна маса тіла одного з п'яти використаних в експериментах самців струмкової форелі становила 343 г.

Загальноприйнятим критерієм оцінки ефективності кріоконсервації статевих клітин тварин є показник збереженості деконсервованого біологічного матеріалу. Збереженість оцінюється як відношення кількості рухливих сперматозоїдів до їх загальної чисельності. На цей показник значною мірою впливають: початкова якість біооб'єкта, склад та спосіб застосування кріоконсерванта, обраний режим заморожування-відтавання. При послідовній реалізації процесу кріоконсервації біооб'єкта зазвичай відбувається зниження його збереженості на кожному з технологічних етапів.

Ефективність підготовленого середовища визначалася через відношення показників збереженості розбавленої сперми до нативної. Для оцінки ефективності технологічного етапу температурної адаптації порівнювалися показники збереженості сперматозоїдів після 30-хвилинного витримування за температури 5°C у середовищі, що не містить кріопротектора, зі збереженістю нативної розбавленої сперми до її охолодження. Оцінка ефективності застосування кріопротектора здійснювалася через співвідношення збереженостей сперматозоїдів у середовищі з кріопротектором та без.

Ефективність вибору режиму заморожування визначали за допомогою порівняння показників збереженості сперматозоїдів до і після заморожування. Ефективність обраного способу кріоконсервації обчислювали через відношення збереженостей деконсервованих сперматозоїдів до нативних (табл. 3).

Таблиця 3. Показники збереженості біооб'єкта (S) та ефективності окремих технологічних етапів процесу кріоконсервації сперми струмкової форелі (W)

Технологічний етап	Показник стану біооб'єкта з початковою часткою активної рухливості сперматозоїдів 90%	
	S, %	W, %
Температурна адаптація	80	88,8
Застосування кріопротектора	65	81,2
Процес заморожування	25	38,5
Процес кріоконсервації	25	28
в цілому		

*Примітка: Систематична похибка вимірювання становить 5%

Як видно з даних таблиці, збереженість деконсервованих сперматозоїдів становила 25% за початкової активності нативної сперми 90%. При цьому, ефективність процесу кріоконсервації, в цілому, перебувала на рівні 28%. Тривалість зберігання розмороженими сперматозоїдами здатності до активного поступального руху після активації у воді в різних пробах становила близько 15–30 с. Наведені дані вказують на досить позитивний ефект застосованого дегідратаційно-вітрифікаційного методу та підібраних режимів кріоконсервації сперми струмкової форелі. Зниження збереженості біооб'єкта спостерігається в



різній мірі, що, вочевидь, залежить від ефективності оптимізації досліджуваних параметрів, їх варіації, а також сумісної взаємодії цих чинників.

Необхідність оцінки ефективності реалізації складових етапів процедури кріоконсервування зумовлена потребою зниження втрат збереженості біооб'єкта на кожному з аналізованих етапів. Це можливо за умов отримання нативних спермій з вищими значеннями початкової активності і за допомогою визначення слабких ланок технологічного ланцюга з подальшим їх посиленням при оптимізації параметрів, які впливають на збереженість біооб'єкта в циклі низькотемпературного кріоконсервування.

Отже, причиною зниження показників ефективності технологічних етапів процесу кріоконсервування є комплекс чинників, які визначають індивідуальні особливості біооб'єкта та склад кріозахисного середовища, до яких слід віднести різні показники рН, осмотичний тиск води для активації спермій та середовища для розбавлення еякулята.

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

На основі результатів власних досліджень та інформації з наукових джерел запропоновано можливість використання дегідратаційно-вітрифікаційного методу кріоконсервації для сперми струмкової форелі.

Проаналізовано вплив технологічних етапів процесу кріоконсервування сперми струмкової форелі на зниження показників збереженості (S) і ефективності (W).

Максимальна збереженість деконсервованої сперми струмкової форелі за початкової активності нативних спермій 90% дорівнювала 25%; ефективність процесу кріоконсервації в цілому перебувала на рівні 28%.

Тривалість зберігання розмороженими сперматозоїдами здатності до активного поступального руху після активації у воді в різних пробах становила близько 15–30 с.

Перспективним напрямом подальших досліджень є отримання потомства струмкової форелі з використанням дефростованої сперми, яка була заморожена за допомогою розробленого дегідратаційно-вітрифікаційного методу кріоконсервації.

ЛІТЕРАТУРА

1. Горбунов Л. В. Кріоконсервація половых клеток и эмбрионов / Л. В. Горбунов, Л. П. Бучацкий. — К., 2005. — 325 с.
2. Кормова база та шляхи відтворення природних популяцій форелі струмкової в річках Прикарпаття / С. В. Кружиліна, А. І. Мрук, І. Ю. Бузевич [та ін.] // Гідробіологічний журнал. — 2010. — Т. 46, № 3. — С. 38—49.
3. Грициняк И. И. Состояние и перспективы воспроизводства редких и исчезающих пресноводных видов лососевых рыб в Украине / И. И. Грициняк, А. И. Мрук // Воспроизводство естественных популяций ценных видов рыб : межд. конф., 20-22 апр., 2010 г. : тез. докл. — СПб., 2010. — С. 48—50.
4. Мрук А. І. Сучасний стан та перспективи відтворення цінних лососевих видів риб в Закарпатті / А. І. Мрук, В. І. Устич, І. І. Маслянка // Проблеми воспроизводства аборигенных видов рыб. — К. : Світ рибалки, 2005. — С. 196—200.
5. Didenko A. Conservation and restoration of native salmonids in Ukrainian Carpathians: perspectives and challenges / A. Didenko, A. Mruk // Advances in the



- Population Ecology of Stream Salmonids : International Symposium, May 17-23, 2010. — Luarca, Asturias, Spain, 2010.
6. Цветкова Л. И. Методическое пособие по криоконсервации спермы карпа, лососевых и осетровых видов рыб / Цветкова Л. И. — М. : ВНИИПРХ, 1997. — 11 с.
 7. Копейка Е. Ф. Инструкция по низкотемпературной консервации спермы карпа : утвержд. Ученым Советом ИПКиК АН УССР (протокол №8 от 18.07.86.) ; Ученым Советом ВНИИПРХ (протокол №13 от 21.07.86.). — М, 1986. — 9 с.
 8. Пат. 6417 Україна, МКВ 7 F25 D 3/10. Пристрій для криоконсервації біологічних об'єктів тваринного та рослинного походження / [Горбунов Л. В., Кабачний В. І., Горбунова Н. І., Гринжевський М. В.] ; заявник і власник Національний фармацевтичний університет. — № 20040706332; заявл. 29.07.2004 ; опубл. 16.05.2005 ; Бюл. № 5. — 10 с.
 9. Филиппов В. Ю. Криоконсервация половых клеток редких и исчезающих видов рыб (ручьевая форель дунайский лосось и хариус европейский) / В. Ю. Филиппов, А. И. Мрук, Л. П. Бучацкий // Воспроизводство естественных популяций ценных видов рыб : межд. конф., 20-22 апр. 2010 г. : тез. докл. — СПб., 2010. — С. 224—225.

REFERENCES

1. Gorbunov, L. V., & Buchackij, L. P. (2005). *Kriokonservacija polovih kletok i jembrionov*. Kyiv.
2. Kruzhylina, S. V., Mruk, A. I., & Buzevych, I. Yu. et al. (2010). Kormova baza ta shliakhy vidtvorennia pryrodnykh populiatsii foreli strumkovoї v richkakh Prykarpattia. *Hidrobiolohichniy zhurnal*, 46 (3), 38-49.
3. Gricinjak, I. I., & Mruk, A. I. (2010). Sostojanie i perspektivy vosproizvodstva redkih i ischezajushhih presnovodnyh vidov lososevyh ryb v Ukraine. *Vosproizvodstvo estestvennyh populjacij cennyh vidov ryb : mezhd. konf., 20-22 aprelja, 2010*. S.Peterburg, 48-50.
4. Mruk, A. I., Ustych, V. I., & Maslianka, I. I. (2005). Suchasnyi stan ta perspektivy vidtvorennia tsinnykh lososevykh vydiv ryb v Zakarpatti. *Problemy vosproyzvodstva aboryhennukh vydiv ryb*, 196-200.
5. Didenko, A., & Mruk, A. (2010). Conservation andrestoration of nativ salmonids in Ukrainian Carpathians: perspectives and challenges. *Advances in the Population Ecology of Stream Salmonids : International Symposium, May 17-23, 2010*. Luarca, Asturias, Spain.
6. Cvetkova, L. I. (1997). Metodicheskoe posobie po kriokonservacii spermy karpa, lososevyh i osetrovyh vidov ryb. Moskva: VNIIPRH.
7. *Instrukcija po nizkotemperaturnoj konservacii spermy karpa*: utverzhd. Uchenym Sovetom IPKiK AN USSR (protokol 8 ot 18.07.86.) ; Uchenym Sovetom VNIIPRH (protokol 13 ot 21.07.86.), (1986). Moskva.
8. Horbunov, L. V., Kabachnyi, V. I., Horbunova, N. I., & Hrynzhhevskiy, M. V. (2005). Prystrii dlia kriokonservatsii biolohichnykh obektiv tvarynnoho ta roslynnoho pokhodzhennia. *Pat. 6417 Ukraina, MKV 7 F25 D 3/10*. (Publ. 16.05.2005; bull. 5.). Ukraina.
9. Filippov, V. Ju., Mruk, A. I., & Buchackij, L. P. (2010). Kriokonservacija polovih kletok redkih i ischezajushhih vidov ryb (ruch'evaja forel' dunajskij losos' i harius evropejskij). *Vosproizvodstvo estestvennyh populjacij cennyh vidov ryb : mezhd. konf. 20-22 apr., 2010*. S.Peterburg.



ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕАЛИЗАЦИИ СОСТАВЛЯЮЩИХ ЭТАПОВ
КРИОКОНСЕРВАЦИИ СПЕРМЫ РУЧЬЕВОЙ ФОРЕЛИ
(*SALMO TRUTTA MORPHA FARIO LINNE*)

В. Ю. Филиппов, v.y.filipov@gmail.com, Институт рыбного хозяйства НААН, г. Киев
А. И. Мрук, amruk@ukr.net, Институт рыбного хозяйства НААН, г. Киев
Л. П. Драган, dragan_l@ukr.net, Институт рыбного хозяйства НААН, г. Киев
Л. Л. Галоян, terteryan2009@mail.ru, Институт рыбного хозяйства НААН, г. Киев
Л. П. Бучацкий, irido1@bigmir.net, Институт рыбного хозяйства НААН, г. Киев

Цель. Провести апробацию разработанного дегидратационно-витрификационного метода на сперме ручьевой форели с оценкой составляющих частей и этапов процесса криоконсервации биообъекта: температурной адаптации, подбора криоконсерванта, режима замораживания-оттаивания, способа криоконсервации в целом.

Методика. Нами разработан и исследуется дегидратационно-витрификационный метод замораживания спермы разных видов рыб. Сбор и обработка данных производились с использованием общепринятых в рыбоводстве методик. Подготовка и разбавление спермы криозащитной средой выполняли согласно утвержденным инструкциям.

Результаты. Исследована возможность криоконсервации спермы ручьевой форели с помощью разработанного дегидратационно-витрификационного метода.

Определено влияние технологических этапов процесса криоконсервации спермы ручьевой форели на снижение показателей сохранности (*S*) и эффективности (*W*). Сохранность размороженных половых клеток ручьевой форели при исходной активности нативных сперматозоидов 90% после размораживания составляла 25%.

Научная новизна. Впервые получен достоверный результат по криоконсервации спермы ручьевой форели с помощью разработанного дегидратационно-витрификационного метода.

Практическая значимость. Показан достаточно положительный эффект использования разработанного метода и подобранных режимов криоконсервации спермы ручьевой форели.

Ключевые слова: криоконсервация, ручьевая форель, сперма, сохранность.

EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF THE IMPLEMENTATION
OF COMPONENT STAGES OF SPERM CRYOPRESERVATION IN BROWN TROUT
(*SALMO TRUTTA MORPHA FARIO LINNE*)

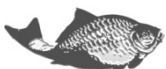
V. Filipov, v.y.filipov@gmail.com, Institute of Fisheries of the NAAS, Kyiv
A. Mruk, amruk@ukr.net, Institute of Fisheries of the NAAS, Kyiv
L. Dragan, dragan_l@ukr.net, Institute of Fisheries of the NAAS, Kyiv
L. Galoyan, terteryan2009@mail.ru, Institute of Fisheries of the NAAS, Kyiv
L. Buchatsky, irido1@bigmir.net, Institute of Fisheries of the NAAS, Kyiv

Purpose. To conduct the approbation of the previously developed dehydration-vitrification method on the sperm of brown trout with a rough estimate of component stages and process steps in the cryopreservation of the biological object: temperature adaptation, cryoprotector selection, of freezing-thawing mode, and cryopreservation method in general.

Methodology. We developed and worked out the dehydration-vitrification method for freezing sperm of different fish species. Data collection and processing were performed by standard fish breeding techniques. Preparing and dilution of sperm by cryoprotective medium were carried out according to approved instructions.

Findigs. We examined the possibility of brown trout sperm cryopreservation with the aid of the developed dehydration-vitrification method. The following conditions for cryopreservation of the biological object were determined: media and cryoprotectors, freezing-thawing modes.

The effect of the technological steps of sperm cryopreservation process in brown trout on the



reduction in preservation (S) and efficiency (W) was analyzed. The preservation of thawed sexual cells in brown trout with 90% initial activity of native sperm was 25%. The total efficiency of cryopreservation process was 28%. Duration of thawed sperm storage with its capacity for active translational movement after activation in water in different samples was about 15–30 seconds. It was noticed that the cause of decline in the efficiency of the cryopreservation process are complex factors such as various pH values, osmotic pressure of water and ejaculate dilution medium. These factors determine individual characteristics of biological objects and cryoprotective medium composition.

Originality. The previously developed dehydration-vitrification method allowed obtaining the reliable result for sperm cryopreservation in brown trout for the first time.

Practical value. The study showed the positive effect of applying the developed method and selected modes of sperm cryopreservation in brown trout.

Keywords: cryopreservation, brown trout, sperm, survival.

