ЛАТВИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ ПЕТРА СТУЧКИ

УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ

ТОМ LXVII

РИГА 1965

ЛАТВИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. П. СТУЧКИ

УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ

ТОМ 67

ИЗДАТЕЛЬСТВО «ЗВАЙГЗНЕ»
РИГА 1965

ЛАТВИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. П. СТУЧКИ

ВОПРОСЫ ФИЗИОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ И БИОХИМИИ

ИЗДАТЕЛЬСТВО «ЗВАЙГЗНЕ»
РИГА 1965

ПРЕДИСЛОВИЕ

В настоящем сборнике трудов нашли свое отражение научно-исследовательские работы кафедры физиологии человека и животных и кафедры биохимии биологического факультета Латвийского государственного университета им. П. Стучки. Этот первый сборник коллективов двух кафедр составлен по материалам, посвященным изучению количественной динамики, физиологической и биохимической роли микроэлементов и витаминов в организме промысловых рыб из внутренних водоемов Латвийской ССР и сельскохозяйственной птицы. Научное направление публикуемых исследований координировано с работой, которая проводится в Институте биологии Академии наук ЛССР. Наряду с этим направлением работ в сборнике опубликованы также результаты экспериментальных исследований по физиологии зимовки сеголеток карпа (Ш. А. Берман), по динамике и биосинтезу холина в прорастающих семенах (Э. А. Циелен), а также изложены основные принципы метода количественного спектрального анализа биологических проб (А. Э. Илзинь).

Сборник представляет интерес для физиологов, биохимиков, ихтиологов, зоотехников и биологов других специальностей.

Редколлегия

УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ ЛАТВИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА
им П. СТУЧКИ, т. LXVII. 1965. ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И БИОХИМИЯ, № 1

М. Р. АПСИТ, Ш. А. БЕРМАН, А. Э. ИЛЗИНЬ

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОДЕРЖАНИЯ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ (меди, марганца, железа и цинка) В ОРГАНИЗМЕ ПРОМЫСЛОВЫХ РЫБ ИЗ ОЗЕРА БУРТНИЕКУ

В отечественной и зарубежной литературе, особенно в последние годы, накопился большой материал, свидетельствующий о физиологической роли микроэлементов в таких жизненно важных процессах организма человека и животных, как рост, развитие, созревание, размножение, кровотворение и др.

В настоящей статье представлены материалы, полученные кафедрой физиологии человека и животных ЛГУ им. П. Стучки в процессе изучения роли микроэлементов в рыбопродуктивности.

Если несколько десятков лет назад единственными незаменимыми микроэлементами для животных считали железо и йод, то в настоящее время этот перечень можно дополнить медью, цинком, марганцем и кобальтом (Э. Андервуд, 1962). Недостаточность или нарушение оптимальных соотношений меди, марганца, железа, цинка, молибдена и кобальта в организме животных и человека является причиной разнообразных патологических состояний (А. И. Войнар, 1960; Я. В. Пейве, 1960; Я. М. Берзинь, 1961; С. Ламб, О. Бентли, Дж. Битти, 1962). Таким образом, баланс микроэлементов в животном организме не менее важен, чем баланс всех других необходимых для жизни веществ.

Физиологическое действие перечисленных микроэлементов объясняется их участием в каталитическом действии ферментов, так называемых металлоэнзимов, в состав которых они входят и образуют разнообразные комплексные соединения.

В настоящее время к числу металлоэнзимов относят 27% всех известных ферментов.

Ответственная биологическая роль микроэлементов меди, марганца, железа, цинка, молибдена и кобальта наряду с макроэлементами магнием и кальцием объясняется, по-види-

мому, тем, что эти металлы образуют, главным образом, центральный атом в комплексных соединениях клетки (В. З. Горкин, 1964).

Микроэлементы функционируют не только в качестве катализаторов, но и в качестве активаторов, т. к. в ничтожно малых количествах неспецифически активируют целый ряд ферментных систем.

В организм наземных животных и человека микроэлементы проникают с пищей. Пища представляет промежуточное звено в движении микроэлементов к животному организму из почвы, которая в конечном счете является первичным источником всех микроэлементов.

Поступление микроэлементов в организм водных животных отличается рядом особенностей. Известно, что минеральные вещества проникают в организм рыб как осмотически через кожу и жабры из окружающей среды, так и через пищеварительный тракт с принятой пищей. Поэтому на химический, в частности, на микроэлементный состав рыб большое влияние оказывает среда обитания. Растворенные в воде соли влияют на рыб как прямым путем, так и косвенным, воздействуя на кормовые организмы или их пищу (Г. В. Никольский, 1963; В. В. Ковальский, 1964).

Между концентрацией растворенных в воде микроэлементов и их физиологическим действием на организм рыб наблюдается определенная зависимость. Так, малые дозы растворенных в воде солей цинка (ниже 0,05 *мг %*) способствуют в значительно большей степени повышению дыхательной функции и газообмена рыб, чем большие дозы (Ш. А. Берман, А. Э. Илзинь, М. Р. Лиепниеце, 1961).

У. Лидер (U. Lieder, 1963) считает токсичной для рыб концентрацию цинка от 0,5 до 1 *мг/л*. Также высокая концентрация меди, 100—1000 *мг/кг* в иле озера, ядовита для рыб. Железо при малых концентрациях — 0,1 *мг/л* — стимулирует рост рыбы, а повышение концентрации до 0,2 *мг/л* — замедляет рост и снижает газообмен (А. Л. Минкина, 1949).

А. И. Венчиков (1962) считает, что истинно физиологическое действие микроэлементов, когда они выступают в качестве биотических факторов, проявляется лишь в таких концентрациях, в каких они содержатся в организме.

Поэтому мы выдвинули задачу изучить содержание и распределение микроэлементов (Cu, Mn, Fe, Zn) в органах и тканях разных промысловых рыб, обитающих в одном из водоемов Латвийской ССР — озере Буртниеку.

Учитывая, что изучаемые нами микроэлементы наряду с незаменимыми аминокислотами, витаминами и основными минеральными веществами составляют жизненно важную

часть пищи, мы сделали попытку сравнить пищевую ценность рыб по микроэлементному составу с другими пищевыми продуктами животного происхождения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Для анализов нами использованы рыбы из озера Буртниеку: лещ, щука, плотва, окунь, линь, гибрид (карп × сазан).

Сбор материала производился в вегетационный период 1963 года. Ихтиофауна озера Буртниеку, по данным И. Лаблайка (1961), представлена большим количеством ценных рыб — лещ, щука, сиг, судак, налим и др., но только часть этих рыб имеет промысловое значение (лещ, щука). Основной ценной промысловой рыбой является лещ. Большинство ценных рыб составляют в уловах ничтожное количество (сиг, судак и др.), в связи с чем в промысле не имеют существенного значения. Большое промысловое значение имеют малоценные рыбы — плотва, окунь (табл. 1).

Таблица 1

Рыбная продукция озера Буртниеку, 1963 г.

Годовой улов (ц)	Отдельные виды рыб в улове в центнерах					
	плотва	лещ	щука	окунь	линь	разн.
669,06	440,03	158,38	36,01	28,80	0,02	5,82

Интерес представляет характеристика анализируемых промысловых рыб с точки зрения их типа питания.

В числе подвергнутых анализу рыб были представлены хищники (щука, окунь), всеядные рыбы (карп, плотва), бентофаги (лещ, линь).

Для анализов брались следующие органы и ткани рыб, достигших половозрелости: мышцы, печень, жабры, почки, кости, чешуя, яичники. Рыбы группировались по виду, величине (возрасту), полу. Количество рыб в группе — от 3 до 10; количество параллельных групп 3—5.

Для определения микроэлементного состава (Cu, Mn, Fe, Zn) анализируемых органов и тканей исследовались параллельно 2—3 средние пробы из каждой группы рыб. Попутно определялось содержание воды, сухого вещества и золы в каждой пробе. Этими данными пользовались для перерасчета количества микроэлементов на сырой вес, т. к. определение их велось в золе. Микроэлементы определялись мето-

дом эмиссионного спектрального анализа (описание метода см. в статье А. Илзинь в данном сборнике). Всего проанализировано 638 рыб.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В нашей республике до сих пор не проводились исследования по количественному составу микроэлементов в различных органах и тканях пресноводных рыб. Наши данные свидетельствуют, что распределение микроэлементов Mn, Cu, Fe, Zn в различных частях тела рыбы не равномерно (табл. 2).

Для большинства животных печень является органом, депонирующим многие элементы — медь, железо, цинк и др. Как видно из табл. 2, эта закономерность характерна и для рыб из озера Буртниеку. Высокой концентрацией марганца, железа и цинка отличаются также жабры рыб, что вполне понятно, учитывая интенсивность физиологических процессов, связанных с дыхательной функцией, газообменом и экскрецией минеральных веществ, протекающих в жабрах (Х. С. Коштоянц, 1950; Н. В. Пучков, 1954). Повышенная концентрация некоторых микроэлементов (Fe, Cu, Zn) в почках, по-видимому, связана, в первую очередь, с выделительной функцией и функцией экскреции этого органа.

Обнаруженное нами высокое содержание цинка в органах и тканях всех промысловых рыб совпадает с имеющимися в литературе сведениями о свойстве рыб концентрировать цинк в некоторых органах — печени, жабрах, почках, сетчатке глаза, островковой ткани поджелудочной железы (Г. С. Карзинкин, 1962, W. Schäperclaus, 1964).

Нас интересовал вопрос, имеются ли видовые отличия в микроэлементном составе анализированных нами пресноводных рыб. Оказалось, что лещ обладает способностью концентрировать марганец в органах и тканях своего тела. Самое большое количество марганца обнаружено в жабрах — 45,1 *мг*% на золу; затем в костях — 25 *мг*% на золу, печени — 20,9 *мг*% на золу. Много марганца также в яичниках. В яичниках обнаружено высокое содержание и всех других микроэлементов.

Способность леща избирательно концентрировать в своем теле марганец видна на примере печени (табл. 2). В печени леща марганца на 83% больше, чем в печени щуки, на 46% больше, чем в печени линя, на 42% больше, чем в печени окуня, на 23% больше, чем в печени плотвы. Для леща характерно также высокое содержание железа в жабрах и яичниках.

В органах и тканях линя по сравнению с остальными видами рыб относительно мало микроэлементов, за исключением печени, которая сравнительно богата медью и цинком.

В теле гибрида (карп × сазан) содержание микроэлементов также невысокое, за исключением большой концентрации цинка в жабрах и меди в чешуе.

Для окуня характерна высокая концентрация железа в печени: на 87% больше, чем у линя, на 60% больше, чем у леща, на 48% больше, чем у плотвы, и на 37% больше, чем у щуки. Однако других особенностей по количественному содержанию микроэлементов у окуня нам обнаружить не удалось.

Щука отличается высокой концентрацией меди в почках (в два раза больше, чем у линя, в три раза больше, чем у леща, и на 45% больше, чем у плотвы).

Плотва по микроэлементному составу органов и тканей занимает промежуточное место среди обследованных промысловых рыб.

На рисунках 1а и 1б сопоставлено содержание микроэлементов в мышцах всех обследованных рыб.

Оказывается, что мышцы леща, подобно печени, жабрам, костям, чешуе содержат значительно больше марганца, чем мышцы всех остальных рыб.

Мышцы окуня и щуки содержат все изучаемые микроэлементы в довольно большом количестве. Мышцы карпа богаты цинком, а мышцы линя по содержанию железа, цинка и меди занимают последнее место. Полученных данных недостаточно, чтобы по микроэлементному составу органов и тканей сделать окончательные выводы о видовой характеристике рыб.

Решение этого вопроса может быть достигнуто лишь с помощью специально поставленных экспериментов.

Однако не вызывает сомнения специфическое отношение леща к марганцу среды. Способность некоторых водных организмов из озера Буртниеку специфически аккумулировать один или другой микроэлемент из окружающей среды доказан в отношении некоторых пищевых объектов рыб. Так, элодеи и хары накапливают марганец и железо до 2,5% — 5% на золу, представители зообентоса (личинки ручейников и хирономид) до 2,7%—5% на золу (А. Э. Илзинь, 1964).

Полученные данные о содержании микроэлементов в органах и тканях пресноводных рыб дают возможность судить о роли рыб в круговороте микроэлементов водной среды.

Изучение микроэлементного состава тела рыб интересно еще потому, что рыба является ценным пищевым продуктом.

Для оценки рыбных пищевых продуктов, с точки зрения их микроэлементного состава, мы пользовались материалами

Содержание марганца, железа, меди и цинка (в *мг*% на золу) в органах

Виды рыб	Микроэлементы													
	Марганец							Железо						
	органы													
	мышцы	печень	жабры	почки	кости	чешуя	яичники	мышцы	печень	жабры	почки	кости	чешуя	яичники
Окунь	4,9	14,7	42,6	—	16	6,8	25	56	758	82,7	—	23	7,9	84
Щука	3,3	11,4	23,3	9,6	10	7,9	7,8	49	608	40,6	587	22	11,4	31
Линь	4,6	14,3	32,7	7,6	4,7	—	6,8	32	404	112	840	5	—	31
Лещ	11,2	20,9	45,1	6,2	25	21,2	29	42	515	395	832	8,4	10	350
Плотва	5,4	16,9	20,4	11,0	20	3,5	22	56	562	193	328	5	3,7	251
Гибрид	11,9	—	32,3	—	—	18,1	—	38	—	81	—	—	6,4	—

Содержание микроэлементов (марганца, железа, меди и цинка) (в *мг/кг*

Животн.	Органы			
	Печень			
	Mn	Fe	Cu	Zn
Латв. бурая порода коров*	3,1 1,1—4,1	57 43—72	37,5 9,7—55,8	68,5 33,7—86
Латв. белая порода свиней*	2,8 1—3,4	128 55—226	6,3 3,3— 8,8	48,2 36 —68,2
Латв. темноголов. порода овец*	3,6 3,5—3,8	64 53—75	53,6 43 —63,7	38,2 35,5—41
Белая леггорн. порода кур*	4,1	172	2,9	34,6
Рыбы из оз. Буртниеку	1,9 1,4—2,5	68,3 49—90	18,1 6,5—28	29,2 25,3—32

* По данным Э. Я. Тауцинь, 1964.

Таблица 2

и тканях промысловых рыб из оз. Буртниеку

Микроэлементы													
Медь							Цинк						
органы													
мышцы	печень	жабры	почки	кости	чешуя	яичники	мышцы	печень	жабры	почки	кости	чешуя	яичники
5,1	53,6	2,2	—	2	0,6	9,5	147	211	130	—	233	73	205
3,6	99	5,3	29	2,9	2	7,4	161	240	286	479	216	165	161
1,6	235	5,3	15	16	—	—	132	269	221	224	—	—	—
2,7	220	2,8	10	2,6	2,4	43	137	249	282	186	125	180	391
3,4	147	2,5	20	1,5	1,2	38	141	248	484	512	127	183	478
3,1	—	5,3	—	—	9,6	—	193	—	1552	—	—	—	—

Таблица 3

в некоторых пищевых продуктах животного происхождения на сырой вес)

Органы							
Мышцы				Почки			
Mn	Fe	Cu	Zn	Mn	Fe	Cu	Zn
0,27	15	0,8	46,5	1,2	83	3,86	23,1
0,27 0,1—0,4	17 12—27	0,9 0,7—1	20,6 17,7—23	1,1 0,5—1,3	56 44—65	3,4 2,1—5,1	19,8 17—25,5
0,6 0,3—0,8	18 15—20	1,3 1,2—1,5	21,7 19 —24	0,1 0,1	42 35—48	2,6 2,5—2,7	21,8 20—23
0,4	17	0,5	19,1	—	—	—	—
0,6 0,3—1,3	5,4 3,8—7	0,4 0,2—0,6	18,2 16 —23	0,7 0,5—0,9	60,3 26—81	1,5 0,8—2,4	28 14,9—40

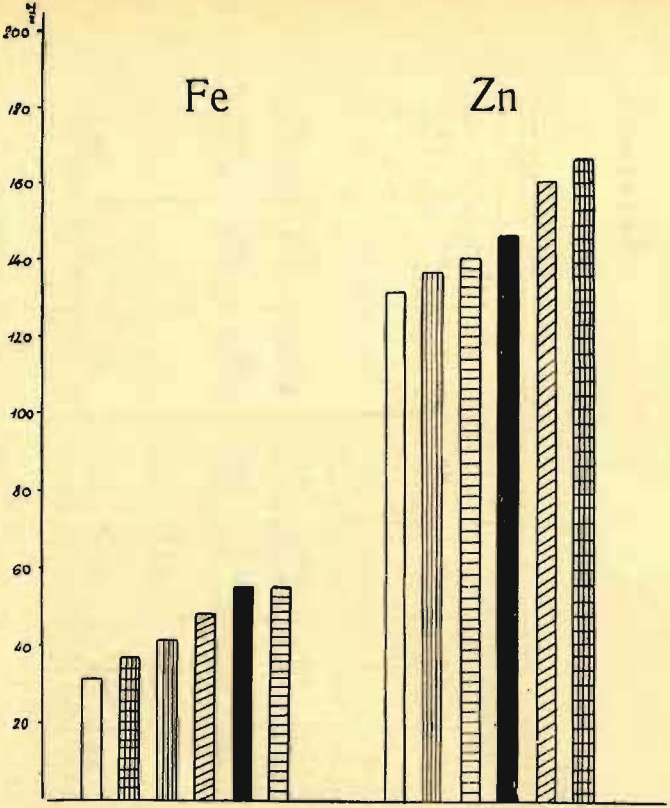


Рис. 1а

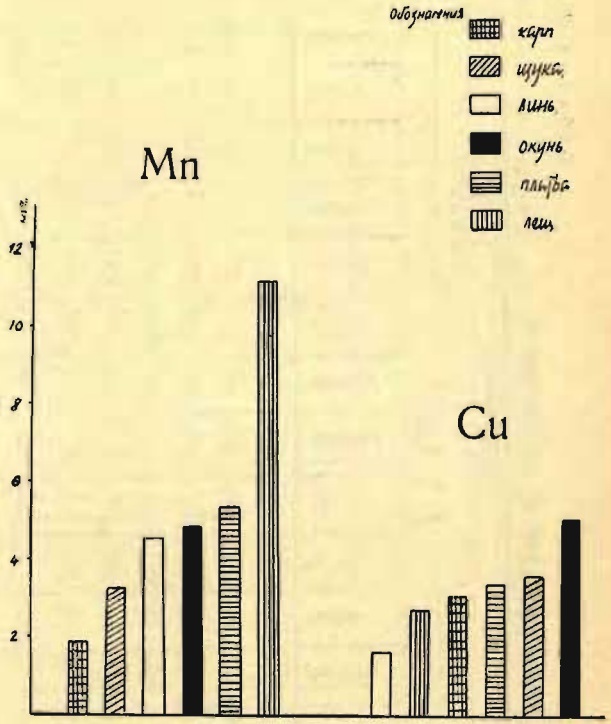


Рис. 1б

Содержание микроэлементов (железа, цинка, марганца и меди) в мышцах промысловых рыб из озера Буртниеку (в *мг*% на золу).

Э. Я. Тауцинь (1964), характеризующими пищевые продукты сельскохозяйственных животных и птиц по содержанию тех же микроэлементов.

Как видно из таблицы 3, печень, мышцы и почки рыб занимают промежуточное место по содержанию марганца, меди, железа и цинка среди соответствующих органов других сельскохозяйственных животных и птиц.

Микроэлементный состав покровных тканей разных животных, как видно из таблицы 4, сравним. Исключение представляет относительно низкое содержание железа в чешуе рыб.

Таблица 4

Содержание марганца, железа, меди и цинка в покровах тела разных животных (в *мг/кг* на сырой вес)

	Марганец	Железо	Медь	Цинк	Автор
Белая шерсть овец породы латв. темноголов.	0,54 0,5—0,6	23 21—25	2,0 1,7—2,4	5,5 4,2—6,8	Тауцинь, 1964.
Перья кур породы белая леггорн	1,2	79	1,0	59,7	Тауцинь, 1964.
Чешуя рыб из оз. Буртниеку	2,2 0,7—4,0	1,5 0,7—2,2	0,6 0,2—1,8	28,5 13,8—34,8	

Таблица 5

Содержание марганца, железа, меди и цинка в яйцах кур и икре рыб (в *мг/кг* на сырой вес)

	Марганец	Железо	Медь	Цинк	Автор
Яйца кур породы белая леггорн	0,8 0,79—0,84	24 23—26	0,82 0,8—0,84	13,9 13,5—14,4	Тауцинь, 1964.
Желток яиц кур породы бел. леггорн	1,8 1,7 —1,8	63 61—67	1,8 1,7—1,8	37,6 36,8—38,7	Тауцинь, 1964.
Белок яиц кур породы бел. леггорн	25 22—27	1,2 1,1— 1,4	0,25 0,24—0,3	0,21 0,2—0,21	Тауцинь, 1964.
Икра рыб из оз. Буртниеку	2,6 0,9—4,5	19,4 4,0—45,5	3,2 1,0—6,6	40,2 21 —62,1	Наши данные

Близкими по микроэлементному составу оказались икра рыб и яйца кур породы белая леггорн (табл. 5). Если по содержанию железа икра несколько уступает яйцу, то по содержанию марганца, меди и цинка яйцо уступает икре.

ВЫВОДЫ

1. Определено количественное содержание марганца, железа, меди и цинка в органах и тканях промысловых рыб из озера Буртниеку.

2. Установлено, что в мышцах, печени, жабрах, костях и чешуе леща содержится больше марганца, чем в соответствующих органах всех других рыб. Органы линя относительно бедны микроэлементами Mn, Fe, Zn.

3. Рыба, как пищевой продукт, занимает среднее место по микроэлементному составу среди других пищевых продуктов животного происхождения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Э. Андервуд. Микроэлементы у животных. В сборнике «Микроэлементы». 1962.
2. Я. М. Берзинь. Микроэлементы в животноводстве, 1961.
3. Ш. Берман, А. Илзинь, М. Лиепниеце. Влияние изменения концентраций цинка в воде на некоторые физиологические процессы в организме рыб. Материалы XXI научно-методической конференции Латвийского государственного университета им. П. Стучки. Рига, апрель 1961
4. А. И. Венчиков. Биотики. М., 1962.
5. А. И. Войнар. Биологическая роль микроэлементов в организме человека и животных. М., 1960.
6. В. З. Горкин. Роль металлов в каталитическом действии ферментов. В сборнике «Ферменты» под ред. акад. А. Е. Браунштейна. М., 1964.
7. А. Э. Илзинь. Минеральный состав плотвы и леща и их пищевых объектов из озер Буртниеку и Рушону Латвийской ССР. Тезисы докладов. XI научная конференция по изучению внутренних водоемов Прибалтики. Петрозаводск, 1964
8. Г. С. Карзинкин. Использование радиоактивных изотопов в рыбном хозяйстве. М., 1962.
9. В. В. Ковальский. Геохимическая экология. Природа. № 3, 1964.
10. Х. С. Коштоянц. Основы сравнительной физиологии, т. I, 1950.
11. С. Лэмб, О. Бентли, Дж. Битти. Микроэлементы. М., ИЛ., 1962.
12. А. Л. Минкина. О влиянии различных концентраций железа на рост и газообмен у рыб, 1949.
13. Г. В. Никольский. Экология рыб. М., 1963.
14. Я. В. Пейве. Микроэлементы и ферменты. Рига, 1960.
15. Н. В. Пучков. Физиология рыб, 1954.

16. I. Lablaika, Burtnieka ezera zivis, to bioloģija un nozveja. P. Stučkas LVU Zinātniskie Raksti, 39. sējums. 1961.
17. U. Lieder, 1963. Über Spurelemente in den Binnen gewässern und ihre Bedeutung für die Binnenfischerei. Deutsche Fischerei-Zeitung, B.X,H-4.
18. Schäperclaus, Ergebnisse eines Fütterungsversuchs mit Kobaltchlorid bei Karpfen und über die Bedeutung der Spurelemente in der Teichwirtschaft im allgemeinen. Deutsche Fischerei-Zeitung. 1964.
19. E. Tauciņš. Minerālvielu daudzums lopbarībā. 1964.

M. R. APSITE, S. A. BEHRMANN, A. E. ILSINA

VERGLEICHENDE CHARAKTERISTIK DES GEHALTES VON SPURELEMENTEN (Kupfer, Mangan, Eisen und Zink) IM ORGANISMUS WIRTSCHAFTLICH WICHTIGSTEN FISCHEN AUS DEM BURTNEKSEE

ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe der Spektralanalyse wurd der Gehalt an Kupfer, Mangan, Eisen und Zink in den Muskeln, der Leber, den Kiemen, den Nieren, den Knochen, den Schuppen und dem Laich geschlechtsreifer Fische (Brechse, Hecht, Plötze, Busch, Schleie) bestimmt.

Es würde ein hoher Gehalt an Zink in den Organen der Süßwasserfische festgestellt. Es besteht augenscheinlich eine artspezifische Selektivität in Bezug auf die einzelnen Spurelemente. So, zum Beispiel, der Brechse speichert vorzüglich Mangan in seinen Organen auf, besonders in den Kiemen, Knochen, Leber, Laich. Im Laich wurde eine hohe Konzentration auch aller übrigen Spurelemente festgestellt. Für den Brechse ist ein reicher Gehalt an Eisen in den Kiemen und im Laich signifikant. In den Organen der Schleie wurde im Gegensatz zu anderen Fischarten ein besonders niedriger Gehalt an Spurelementen gefunden. Die Plötze nimmt bezüglich des Gehaltes an Spurelementen eine mittlere Stellung ein. Eine besondere Fähigkeit zur Aufspeicherung von Mangan und Eisen wurde im Burtneksee bei einigen Wasserpflanzen, Algen und Zoobentosarten beobachtet (von 1,5—5% in der Asche). Bezug auf den Gehalt an Spurelementen eine Gleichwertigkeit der Süßwasserfische und der Nahrungsmitteln aus der übrigen Tierwelt festzustellen.

УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ ЛАТВИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА
им. П. СТУЧКИ. т. LXVII. 1965. ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И БИОХИМИЯ. № 2

А. ИЛЗИНЯ

МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО СПЕКТРАЛЬНОГО АНАЛИЗА БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБ

Исследования содержания микроэлементов в биологических объектах лимитируются методическими трудностями, так как микроэлементы обычно составляют сотые доли процента общей массы анализируемого материала.

Существуют несколько известных и общепринятых методов для количественного определения микроэлементов: колориметрический, полярографический, спектрографический и др.

С нашей точки зрения перспективным является спектрографический метод (А. Э. Илзиня, 1963 г.), который имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами:

1) в одной пробе возможно одновременно определить ряд микроэлементов без их предварительного разделения;

2) метод количественного спектрального анализа характеризуется относительно большой чувствительностью. Низшим пределом, до которого спектрально можно определить многие элементы (медь, серебро, железо и др.), является миллионная часть ($n \cdot 10^{-6}$) анализируемого элемента в пробе (Р. Л. Митчелл, 1962). Следует отметить, что химические элементы спектрально определяются с разной чувствительностью. Относительная чувствительность определения различных элементов в дуге постоянного тока методом спектрального анализа, по данным А. Н. Зайделя и др. авторов (1960 г.), показана в таблице 1;

3) при фотографической методике спектрального анализа — спектрографии — сохраняются документальные данные о составе пробы, которые можно снова использовать, если в этом окажется необходимость;

4) оптимальным количеством анализируемого материала (золы органов и тканей животных и растений) при спектральном анализе является 10—20 *мг* (Г. А. Бабенко, 1962 г.). Это важно при анализе таких биологических проб, как

Таблица 1

Относительная чувствительность определения различных элементов в дуге постоянного тока (в 10^{-4} %)

Элемент	Чувствительность	Элемент	Чувствительность	Элемент	Чувствительность
Ag	0,5	Ge	5	Pt	50
Al	2	Hf	100	Rb	1
As	100	Hg	100	Re	100
Au	10	Ho	10	Rh	10
B	10	In	1	Ru	10
Ba	5	Ir	50	Sb	20
Be	10	K	2	Sc	2
Bi	20	La	10	Si	20
Ca	2	Li	1	Sm	500
Cd	510	Lu	10	Sn	10
Ce	500	Mg	2	Sr	5
Co	10	Mn	10	Ta	10
Cr	1	Mo	5	Tb	10
Cs	3	Na	0,5	Te	200
Cu	0,5	Nb	30	Th	100
Dy	10	Nd	10	Ti	10
Er	10	Ni	5	Tl	1
Eu	10	Os	50	Tu	10
F	100	P	100	U	100
Fe	5	Pb	5	V	5
Ga	3	Pd	10	W	20
Gd	200	Pr	10	J	10
				Yb	10
				Zn	3
				Zr	10

некоторые органы и ткани мелких животных, в частности, желчь, почки, селезенка и др. органы рыб;

5) при налаженной методике проведение количественного спектрального анализа биологических объектов требует значительно меньше времени, чем определение микроэлементов химическим путем.

I. ПРИНЦИПЫ СПЕКТРАЛЬНОГО АНАЛИЗА

В основе спектрального анализа лежит изучение света, который излучается (в случае эмиссионного спектрального анализа) или поглощается (в случае абсорбционного спектрального анализа) анализируемым веществом.

Определение химического состава веществ при помощи эмиссионного спектрального анализа, о котором идет речь в данной статье, базируется на свойстве химического элемента под действием дополнительной энергии переходить в возбужденное состояние и излучать при этом кванты энергии. Установлено, что излучение веществ в газообразном состоянии определяется их химическим составом, и поэтому пробу при эмиссионном спектральном анализе необходимо испарить. Источниками возбуждения служат электрическая дуга, искра, пламя.

В электрической дуге сгорание образца наиболее полное, легче, чем в других источниках, образуется характерный спектр анализируемого вещества (Дж. Гаррисон и др., 1950 г.). При количественном спектральном анализе биологических проб обычно используют дугу переменного тока, получаемую генератором дуги ДГ-2.

В дуге происходят следующие процессы:

1) испарение анализируемого образца;
2) диссоциация молекул на атомы или атомные ионы;
3) возбуждение диссоциированных атомов или ионов;
4) излучение квантов энергии возбужденными атомами и ионами.

Суммарное излучение источника света складывается из излучений атомов всех элементов, присутствующих в пробе. Каждый химический элемент, в зависимости от строения атома, излучает световые волны с определенной длиной.

Для анализа необходимо отделить излучение каждого элемента. Это осуществляется с помощью оптической системы спектрального аппарата, в которой световые лучи с разными длинами волн отделяются в пространстве друг от друга, и фиксируется на фотопластинке.

Таким образом получаем спектр, т. е. разложенное по длинам волн излучение источника света.

Следующим этапом является расшифровка полученных спектрограмм. Критерием наличия искомого элемента в пробе является присутствие в спектрограмме определенных линий, характерных для данного элемента. Однако нет необходимости установить все характерные данному элементу линии. Достаточно обнаружить в спектрограмме лишь так называемые последние линии.

Аналитические линии исследуемого элемента должны находиться на участке, где нет близко расположенных линий какого-либо другого элемента, имеющегося в пробе, чтобы линии не накладывались одна на другую.

Нами были использованы линии со следующими длинами волн:

для марганца	— 2801,1 Å
для кремния	— 2881,6 Å
для железа	— 3020,6 Å
для алюминия	— 3082,2 Å
	— 3183,4 Å
для ванадия	— 3183,9 Å
	— 3185,4 Å
для меди	— 3247,5 Å
	или
	3273,9 Å
для цинка	— 3345,0 Å
	— 3345,6 Å
	3345,8 Å
для кобальта	— 3431,6 Å
	— 3433,0 Å
для титана	— 3958,2 Å
для хрома	— 4254,3 Å
для бария	— 4554,0 Å
для стронция	— 4607,3 Å

Расшифровка спектрограмм, т. е. нахождение аналитических линий, обычно производится по спектру железа, который снимается на каждой фотопластинке наряду с анализируемыми пробами.

Имеются многие атласы (С. К. Калинин и др., 1959 г., Л. А. Индинченко, 1960 г.), в которых приведены увеличенные фотографии дугового спектра железа. Рядом с изображением спектра железа приведена шкала длины волн и указаны места расположения всех линий других элементов (см. рисунок 1).

Для осмотра увеличенного изображения спектрограмм проб и железа на фотопластинках и сравнения с таблицами атласа служат измерительные микроскопы, спектропроекторы и другие вспомогательные приборы.

Таковы основные принципы качественного спектрального анализа, который должен предшествовать каждому количественному спектральному анализу.

Благодаря быстроте и точности, качественный спектральный анализ незаменим во многих отраслях науки и техники, например, в металлургии и др.

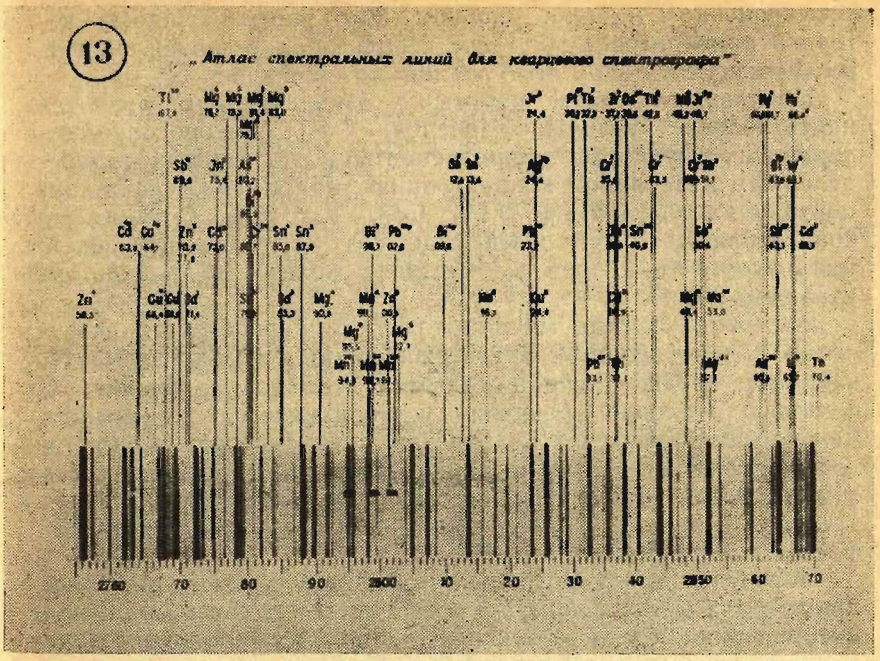


Рис. 1. **Таблица из атласа спектральных линий для кварцевого спектрографа.**

В биологических объектах при определении микроэлементного состава органов и тканей особое значение приобретает их количественная характеристика.

В основу количественного спектрального анализа положен эмпирически установленный факт: чем больше атомов определенного элемента в единицу времени находятся в возбужденном состоянии, тем интенсивнее излучаемый свет, т. е. темнее характерные для этого элемента линии в спектрограмме на фотопластинке.

Спектрографический метод применим для количественного анализа любого элемента, который может быть определен качественно. К таким относятся в первую очередь металлы и металлоиды в пределах концентраций, не превышающих 5% общей массы (Б. Е. Гордон, 1962 г.).

Для осуществления количественного спектрального анализа микроэлементов по спектрограмме пользуются несколькими методами — методом добавок, методом трех эталонов и др. Мы остановились на последнем, т. е. методе трех эталонов Цейса (С. Л. Мандельштам, 1946 г.), как на более рас-

пространенном и более удобном. Этот метод, сущность которого приводится ниже, был использован в нашей работе, но мы пользовались пятью эталонами сравнения.

Начальным этапом работы с этим методом является приготовление эталонов сравнения — т. е. смеси солей, содержащих изучаемые микроэлементы в убывающих с определенным интервалом концентрациях, например, меди в концентрациях 1%, 0,316%, 0,1%, 0,0316%, 0,01%. В таких же концентрациях смесь солей содержат и другие изучаемые микроэлементы, например, марганец, железо (подробнее см. страницу 26).

В первую очередь микрофотометром определяется интенсивность почернения аналитической линии искомого элемента, например, меди, в спектрограммах эталонов сравнения. С помощью эталонов сравнения устанавливается зависимость между интенсивностью почернения аналитической линии и логарифмом концентрации микроэлемента. Эту зависимость обычно представляют графически. Полученная с помощью эталонов сравнения кривая называется градуировочным графиком (см. подробнее стр. 29, 30).

Пользуясь градуировочным графиком, построенным, например, для меди, и показателями микрофотометра при фотометрировании соответствующей аналитической линии меди в спектрограмме испытуемой пробы на этой же фотопластинке, можно определить содержание данного микроэлемента (меди) в % общей массы золы, т. е. произвести количественный спектральный анализ меди.

Важно учесть, что интенсивность почернения спектральных линий при спектрографии зависит не только от содержания в пробе анализируемого элемента, но и от качественного и количественного содержания сопутствующих элементов. Например, почернение аналитической линии 1% цинка на базе хлористого натрия будет менее интенсивное, чем на базе золота. Элементы с низкими температурами плавления и низкими ионизационными потенциалами, как щелочные металлы, сильно влияют на интенсивность спектральных линий других элементов уже в небольших концентрациях (Дж. Гаррисон и др., 1950 г.).

II. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ЭТАЛОНОВ СРАВНЕНИЯ

Приготовлению эталонов сравнения, как наиболее ответственному этапу в разработке методики количественного определения микроэлементов, мы посвящаем специальный раздел.

Некоторые авторы, например, Дж. Гаррисон, Р. Лорд, Дж. Луфбуров (1950 г.), считают эту часть работы наиболее трудоемкой.

Эталоны сравнения должны быть приготовлены на солевой смеси, т. е. основе, близкой по макроэлементному составу к анализируемой пробе.

Основу или матрицу для приготовления эталонов сравнения можно получить несколькими способами. Наилучший из них, но довольно сложный, следующий: путем сжигания биологического материала получают золу анализируемых объектов; экстракцией соответствующими реагентами полностью очищают золу от искомых элементов и затем к этой основе добавляют анализируемые микроэлементы в известных концентрациях.

Мы применяли другой способ приготовления основы — смешивание спектрально-чистых солей макроэлементов в таких соотношениях, какие примерно имеются в анализируемом объекте, например, в мышцах, печени и т. д.

Основную массу золы органов и тканей животных составляют соли натрия, калия, кальция и магния (С. Я. Капланский, 1938 г., А. П. Виноградов, 1938 г.). Из смеси этих солей готовится основа для эталонов сравения. Предварительно рекомендуется производить анализ макроэлементного состава золы анализируемых органов и тканей (А. Войнар, 1958 г.).

По макроэлементному составу мышечной и костной ткани, крови, печени и др. органов высших животных и человека имеются обширные сведения в литературе, и эти анализы провести нет необходимости.

Приводим пример приготовления эталонов сравнения для количественного определения меди, марганца, железа и цинка в икре рыб.

По нашим данным, зола икры рыб содержит:

натрия	— 5,5	весовых	частей
калия	— 26,4	„	„
кальция	— 10,0	„	„
магния	— 4,0	„	„

Для сохранения соотношений макроэлементов в основе такой же, как в золе икры рыб, была приготовлена смесь хлоридов:

хлорид натрия	— 14,0	весовых	частей
хлорид калия	— 50,5	„	„
хлорид кальция	— 27,4	„	„
хлорид магния	— 15,6	„	„

Для приготовления эталонов сравнения пригодны лишь спектрально чистые соли. Солевая смесь, имитирующая макроэлементный состав и процентные соотношения между элементами, нами готовилась из хлоридов натрия, калия, кальция и магния. Основу можно приготовить также из других спектрально-чистых солей металлов.

Мы готовили эталоны сравнения, содержащие микроэлементы марганец, железо и медь в концентрациях 1%, 0,316%*, 0,1%, 0,0316%, 0,01%, а цинк в более высоких концентрациях — 10%, 3,16%, 1%, 0,316%, 0,1% в связи с относительно низкой спектральной чувствительностью цинка, с которой цинк определяется в биологических пробах.

Вначале на основе из макроэлементов готовится исходная смесь, содержащая по 1% марганца, железа и меди и 10% цинка. Путем постепенного разбавления исходной смеси основой получают следующие низшие концентрации. Для этого к 0,316 *г* исходной смеси прибавляют 0,684 *г* основы и в течение 15 минут тщательно растирают в ступке из органического стекла или другой пластмассы.

Таким образом получают смесь, содержащую по 0,316% меди, марганца и железа и 3,16% цинка. Из этой смеси аналогичным способом получают последующие более низкие концентрации.

Подробно методика приготовления эталонов сравнения описана в книге Р. Л. Митчелла (R. L. Mitchell, 1948).

III. ПОДГОТОВКА ИСПЫТУЕМЫХ ПРОБ И ЭТАЛОНОВ СРАВНЕНИЯ К СПЕКТРОГРАФИИ

Биологический материал (в наших опытах органы и ткани рыб) высушивается в термостате при t° 105°С до постоянного веса.

Полученный сухой остаток озоляется в кварцевых тиглях в муфельной печи. Чтобы избежать потери микроэлементов, возможные при быстром сгорании органических веществ, озоление проводят постепенно, начиная с температуры 100—150°С. После обугливания температуру повышают до 450—470°С. Температура в муфельной печи не должна превышать

* Концентрацией 0,316% желательно пользоваться ввиду того, что мантисса логарифма от этого числа равна 5. Это удобно при построении градуировочного графика, т. к. получаем больше точек в интервале рабочих концентраций.

500°C во избежание потери некоторых металлов вследствие сублимации.

Минерализация проводится до получения золы белого цвета, указывающего на полное отсутствие углерода.

Кости, жаберные дуги, чешуя минерализуются сравнительно легко. Медленно и трудно минерализуются печень, почки, икра. Этот процесс ускоряют окислителем — концентрированной азотной кислотой, которой смачивают пробы во время озоления. Можно пользоваться также методом озоления парами азотной кислоты, предложенным Г. Ринькисом (G. Riņķis, 1964. g.).

В результате озоления получаются окиси или нитраты металлов. Однако, как было сказано выше, основы для эталонов сравнения готовились из хлоридов металлов.

Чтобы идентифицировать озоленные пробы с эталонами сравнения, в конце процесса минерализации пробы смачиваются концентрированной соляной кислотой и высушиваются при температуре 150—200°C.

В результате анализируемые пробы содержат хлориды металлов.

Для анализов микроэлементного состава нами бралось 20 *мг* золы испытуемых проб. Это количество золы смешивалось с 10 *мг* спектрально-чистого угольного порошка. Таким же способом готовились для спектрографии эталоны сравнения.

Смешивание с угольным порошком значительно повышает точность результатов, так как способствует более равномерному испарению пробы при горении дуги.

Приготовленные таким образом к спектральному анализу испытуемые пробы и также эталоны сравнения помещают в кратер нижнего спектрально-чистого угольного электрода. Верхним электродом служит угольный стержень, заточенный ввиде конуса.

При спектральном анализе биологических проб обычно пользуются электродами из графита или угля. Этот выбор обусловливается высокой термостойкостью и возможностью получения этих материалов в спектрально-чистом виде.

Известно, что на точность анализа отрицательно влияет выбрасывание анализируемого вещества из кратера электрода во время зажигания и горения дуги.

Для устранения этого мы пользовались электродами закрытого типа, изготовленными по предложению проф. Г. А. Бабенко (1962 г.), которые полностью устраняют возможность потери анализируемого вещества во время зажигания и горения дуги (см. рисунок 2).

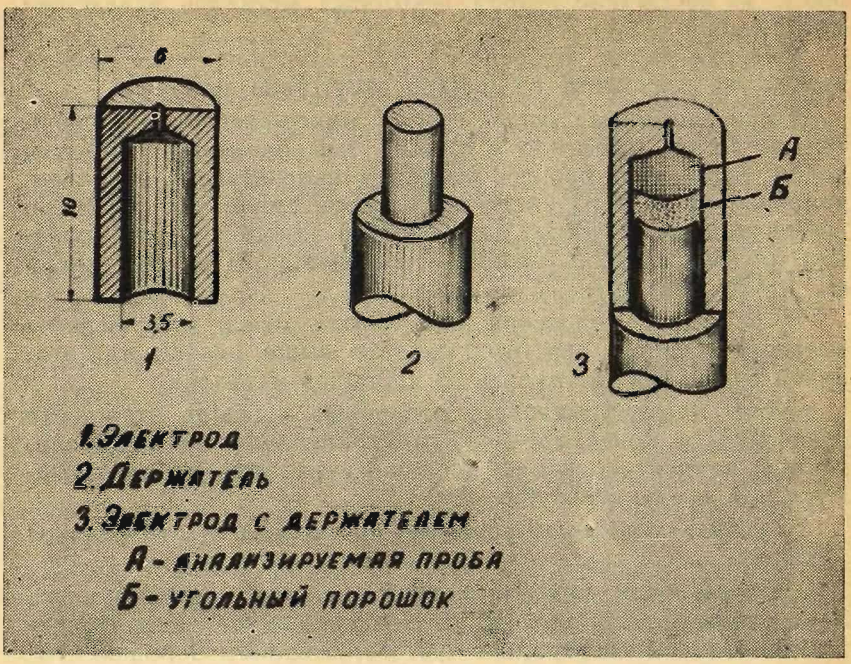


Рис. 2. Схематическое изображение электрода.

IV. СНЯТИЕ СПЕКТРОГРАММ И ИХ ОБРАБОТКА

Для получения и регистрации спектров мы пользовались спектрографом «ИСП-30». Возбуждение спектра анализируемой пробы осуществлялось генератором дуги «ДГ-2».

Условия съемки в наших опытах были следующие:

сила тока — 8 ампер; расстояние между электродами — 2 миллиметра; время экспозиции для испытуемых проб и для эталонов сравнения — 2 минуты (3 секунды обжиг), для спектра железа — 30 секунд, для шкалы — 5 секунд; ширина щели спектрографа — 0,014 миллиметра. Мы пользовались фотопластинками «спектральные» типа I.

Порядок съемки следующий: сначала снимается шкала спектрографа и спектр железа, с помощью которых производится расшифровка спектрограмм. Затем следует съемка параллельных проб эталонов сравнения и золы испытуемых проб. В конце опять снимаются спектр железа и шкала спектрографа.

Полученные спектрограммы фотометрируются на микрофотометре МФ-2.

В своих анализах мы не пользовались внутренним стандартом, а на основании ряда работ (Г. А. Бабенко, 1962 г., И. П. Ипатов и др., 1960 г.) в качестве внутреннего стандарта использовали фон спектрограммы.

Приводим результаты фотометрирования спектральной пластинки № 35. На этой пластинке сняты спектрограммы эталонов сравнения в пяти концентрациях для количественного определения меди, марганца, железа и цинка в икре рыб и также пробы золы, полученной из икры плотвы (для всех объектов по две параллельные пробы).

Иллюстрируем лишь несколько примеров по количественному определению меди (таблица 2).

Градуировочный график показан на рисунке 3.

На оси ординат откладываются показания микрофотометра (ΔS*), а на оси абсцисс — логарифм процентного содержания анализируемого элемента в эталонах сравнения ($\lg C$).

Таблица 2

Результаты фотометрии и количественного определения меди в икре плотвы

№№ п/п	Объект исследования	$S \cdot 10^2$	$S_ф \cdot 10^2$	$\Delta S \cdot 10^2$	ΔS 10^2 (средн.)	$\lg C$	C (в % на золу)	C (в мг % на золу)
1	Эталон сравнения № 1	175	0	175	176	$\bar{0},00$	1,00	1000
2	Эталон сравнения № 1	178	1	177				
3	Эталон сравнения № 2	148	0	147	148	$\bar{1},50$	0,316	316
4	Эталон сравнения № 2	150	1	149				
5	Эталон сравнения № 3	123	1	122	121	$\bar{1},00$	0,100	100
6	Эталон сравнения № 3	120	0	120				
7	Эталон сравнения № 4	96	0	96	95	$\bar{2},50$	0,0316	31,6
8	Эталон сравнения № 4	94	0	94				
9	Эталон сравнения № 5	72	0	72	73	$\bar{2},00$	0,010	10,0
10	Эталон сравнения № 5	74	0	74				
11	Зола икры «R-275»	99	0	99	100	$\bar{2},62$	0,417	41,7
12	Зола икры «R-275»	102	1	101				
13	Зола икры «R-336»	104	1	103	102	$\bar{2},68$	0,479	47,8
14	Зола икры «R-336»	102	1	101				
15	Зола икры «R-333»	103	0	103	103	$\bar{2},69$	0,490	49,0
16	Зола икры «R-333»	103	0	103				

* $\Delta S = S - S_ф$, где S — почернение аналитической линии, $S_ф$ — почернение фона.

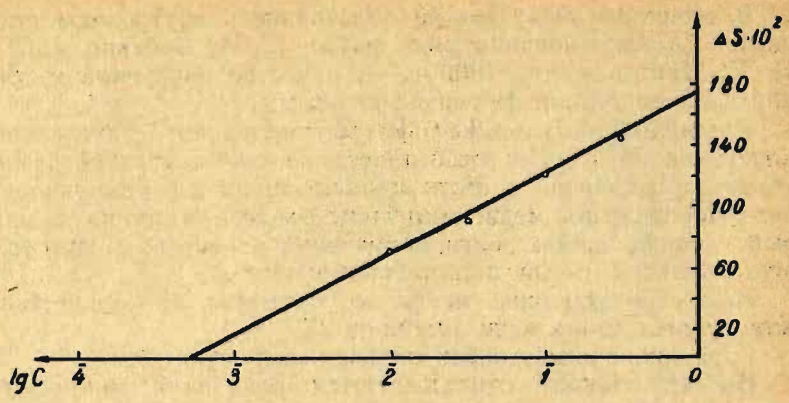


Рис. 3. Градуировочный график для количественного определения меди (спектральная пластинка № 35).

Из этого градуировочного графика вычисляется содержание меди в пробах, снятых на этой же пластинке в *мг*% на золу икры (С).

Определяя процентное содержание золы, сухого вещества и воды в испытуемых органах, можно путем пересчетов определить содержание микроэлементов не только в золе, но и в сыром веществе. Метод спектрального анализа применим также для анализа почвы и вод. (В. Я. Еременко, 1960 г., А. Д. Миллер, П. А. Степанов, 1959 г., Seppo Wilska 1951, R. L. Mitchell, 1948).

V. ТОЧНОСТЬ СПЕКТРАЛЬНОГО АНАЛИЗА

Говоря о точности спектрального анализа, следует строго разграничить систематические и случайные ошибки метода.

В спектральном анализе причиной систематических ошибок преимущественно являются эталоны сравнения. Практически почти невозможно приготовить эталоны сравнения во всех отношениях тождественные с пробой, отличающиеся от нее только содержанием анализируемого элемента. Обычно встречающиеся отличия зависят главным образом от химического состава эталона и от некоторых других свойств (плотности, степени дисперсии и др.) не совпадающих с анализируемыми пробами. В какой степени эти отличия влияют на интенсивность аналитических линий, может быть решено только опытным путем.

Понятно, что систематическая ошибка при проведении серии анализов не будет влиять на изучаемую динамику элементов, но исказит абсолютные данные анализа.

Статистическая обработка результатов не дает возможности установить ошибки, общие для всей серии измерений, т. е. систематические ошибки.

Поэтому рекомендуется полученные результаты анализов дополнительно проверить методом добавок или другими методами (А. Н. Зайдель и др., 1960 г.).

Некоторые ученые (Р. Л. Митчелл, 1955 г.) считают, что результаты анализов микроэлементов, полученные параллельно колориметрическим методом и спектральным методом, совпадают в пределах ошибки.

Имеющиеся в нашем распоряжении материалы также свидетельствуют, если не о полном совпадении, то о близости результатов, полученных параллельно двумя названными методами. В 1961 году определение микроэлементов цинка и меди в органах и тканях рыб проводилось нами колориметрическим (дитизонным) методом, а в 1963 году эти же микроэлементы определялись спектрографически. В таблице 3 приводим результаты, полученные каждым из этих методов при анализе мышц и печени плотвы.

Таблица 3

Сопоставление результатов определения меди и цинка в мышцах и печени плотвы колориметрическим и спектрографическим методами (в *мг* % на золу)

№№ п/п	Проанализированные органы и ткани	Cu		Zn	
		по данным спектрального анализа	по данным колориметрического анализа	по данным спектрального анализа	по данным колориметрического анализа
1	Мышцы	3,2	4,2	126,4	100,0
2	Печень	86,8	79,2	305,2	308,0

Из таблицы 3 видно, что результаты наших анализов являются весьма близкими, если учесть, что рыбы, анализированные спектрографически в 1963 году, получены из озера Буртниеку, а анализированные колориметрическим методом в 1961 году — из Кегумского водохранилища реки Даугава. Наш материал, по сравнению микроэлементного состава органов и тканей рыб одного вида из разных водоемов, свидетельствует о влиянии факторов среды на микроэлементный состав организма (см. статью А. Э. Илзинь в данном сборнике стр. 45).

Определение случайных ошибок дает возможность судить о том, какова воспроизводимость результатов измерения одной и той же величины при многократном повторении.

Случайные ошибки спектрального анализа можно разделить на несколько групп:

1) связанные с неоднородностью проб и эталонов сравнения;

2) с процессом возбуждения спектра;

3) с методом регистрации.

Как говорилось выше, эталоны сравнения обычно являются источником систематических ошибок, но они могут быть также источником случайных ошибок, например, при погрешности в содержании известных концентраций анализируемого элемента.

Ошибки, определяемые источником возбуждения — т. е. непостоянством условий разряда, часто связаны с колебанием силы разрядного тока, колебанием пробивного напряжения и т. д. Установлено, что в зависимости от типа источника и условий анализа эти ошибки могут колебаться в довольно широких пределах (А. Н. Зайдель и др., 1960 г.). Для уменьшения подобных ошибок предложено применение электродов закрытого типа, полностью устраняющих выбрасывание пробы во время зажигания дуги (Г. А. Бабенко, 1961 г. (а)), а также модификация схемы генератора ДГ-2 (Г. А. Бабенко, 1961 г. (б)). По данным проф. Бабенко, эти дополнения значительно повышают точность результатов.

Фотографическая регистрация спектров приводит к ошибкам, связанным главным образом со свойствами фотопластинок, но эта ошибка незначительная (К. И. Ионова, В. В. Налимов, 1955 г.). Точность результатов зависит также от правильности построения градуировочного графика. Поэтому обычно употребляют больше трех эталонов сравнения (в наших опытах — пять). Чтобы уменьшить ошибку, получаемую при построении градуировочного графика, значения концентраций в эталонах, по которым строится график, не должны лежать вне тех значений, которые нужно анализировать.

В ряде работ (Е. Л. Гринзайд, 1955 г., К. И. Иванова, В. В. Налимов, 1955 г.) специально исследовался вопрос о величине ошибок при спектрально-аналитических исследованиях.

Авторы установили, что общая ошибка отдельного измерения колеблется в пределах 9—10%, и главная доля падает на ошибку, вносимую источником возбуждения (3—9%).

По данным Дж. Гаррисона (1950 г.), вполне достижимой является точность ±2% от общего количества анализируе-

мого элемента в образце. Р. Л. Митчелл (1962 г.) отмечает, что в дуге постоянного тока возможно получить относительную ошибку воспроизводимости (при анализе биологических проб) в пределах от 1,5 до 3,5%, а вообще ошибки отдельных определений большинства элементов редко превышают ±10%.

Нами специальных работ по определению точности спектрального анализа не проводилось.

ЛИТЕРАТУРА

1. Г. А. Бабенко. Ионизирующее излучение и микроэлементы. Докт. диссертация, Станислав, 1962.

2. Г. А. Бабенко. Метод виготовлення електродів що запобігають при горінні дуги викиданню досліджуваної речовини». Наукові записки, вип. IV, Станіславський Державний Медичний Інститут, 1961а.

3. Доц. Г. А. Бабенко, та інженер К. В. Милославський. Використання стационарноу діатермії ДТ-500 як генератора дуги змінного струму в практиці спектрального аналізу. Наукові записки, вип. IV, Станіславський Державний Медичний Інститут, 1961б.

4. А. П. Виноградов. Химический элементарный состав организмов моря. Тр. биогеохимической лаборатории АН СССР. Т. VI, 1938.

5. А. О. Войнар. Совместное применение спектрографической, микрохимической, электрофоретической и счетной методик для определения малых концентраций микроэлементов в биологических объектах. Материалы X Всесоюзного совещания по спектроскопии. Т. II. Львовский университет, 1958.

6. Дж. Гаррисон. Р. Лорд, Дж. Луфбуров. Практическая спектроскопия. М., 1950.

7. Б. Е. Гордон. Спектральный эмиссионный анализ и его применение в криминалистике, судебной химии и судебной медицине, Киев, 1962.

8. Е. Л. Гринзайд. Оценка погрешностей, возникающих в отдельных звеньях спектрографического анализа. Изв. АН СССР, сер. физ. Т. XIX, № 1, 1955.

9. В. Я. Еременко. Спектрографическое определение микроэлементов в природных водах, М., 1960.

10. А. Н. Зайдель, Н. И. Калитеевский, Л. В. Линис, М. П. Чайка. Эмиссионный спектральный анализ атомных материалов. Л.—М., 1960.

11. А. Э. Илзиня. Использование спектрографического метода для определения микроэлементов в организме рыб. Материалы XXIII научно-методической конференции Латвийского государственного университета им. П. Стучки. Рига, 1963.

12. Л. Н. Индинченко. Спектральный анализ минеральных веществ. М., 1960.

13. К. И. Ионова, В. В. Налимов. Статистическое изучение точности спектрографического анализа нелегированных сталей. Изв. АН СССР, сер. физ. Т. XIX, № 1, 1955.

14. И. П. Ипатов, Н. А. Токовой и др. Методика количественного спектрального анализа порошкообразных биологических проб. Сб.

Некоторые вопросы эмиссионной и молекулярной спектроскопии. Красноярск, 1960.
15. С. К. Калинин, А. А. Явнель, А. И. Алексеева и др. Атлас спектральных линий для кварцевого спектрографа. М., 1959.
16. С. Я. Капланский. Минеральный обмен. М., 1938.
17. С. Л. Мандельштам. Введение в спектральный анализ. М., 1946.
18. А. Д. Миллер, П. А. Степанов. Спектральное определение микроэлементов в водах и вытяжках на основе соосаждения с сульфидом кадмия. Обмен опытом Всесоюзного института техники разведки, вып. 17. Мин. геологии и охраны недр СССР, Л., 1959.
19. Р. Л. Митчелл (Mitchell R. L.). Определение следов элементов в растениях и других биологических объектах. Сб. Анализ следов элементов под ред. Дж. Йо и Г. Коха. М., 1961.
20. Л. В. Строк (Strock L. W.). Эмиссионный спектрохимический анализ. Сб. Анализ следов элементов под ред. Дж. Йо и Г. Коха. М., 1961.
21. G. Riņķis. Makroelementu un mikroelementu noteikšana. Rīgā, 1964.
22. R. L. Mitchell. The Spectrographic Analysis of Soils, Plants and related Materials. Harpenden, Common Burean of Soil Science, 1948.
23. Seppo Wilska. Quantitative Spectral Analysis of Trace Elements in Water. Acta Chemica Scandinavica. 5 1951.

A. ILZINA

METHODS OF THE QUANTITATIVE SPECTRAL ANALYSIS IN BIOLOGICAL SAMPLES

SUMMARY

In the article the principles of the qualitative and quantitative spectral analysis are described. It has been found desirable to make quantitative determination of some trace elements (copper, manganese, iron, zinc etc.) directly in the ash of organs and tissues of fishes, without chemical pretreatment.

For the quantitative determination it is necessary to make a series of standard mixtures, which contain the major constituents (salts of natrium, potassium, calcium and magnesium) in amounts as close as possible to those normally occurring in the sample being analysed, and the trace elements (to be determined) in incremental amounts, aying usually from 1% — 0,001%.

More reproducible results were obtained by using the type of electrodes recommended by prof. Babenko.

The results for copper and zinc (spectrographic and colorimetric methods) show no significant difference.

УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ ЛАТВИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА им. П. СТУЧКИ, т. LXVII. 1965. ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И БИОХИМИЯ, № 3

Ш. БЕРМАН, А. ЗИЕДИНЬ

ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА МИКРОЭЛЕМЕНТОВ ЖЕЛЕЗА, МЕДИ И МАРГАНЦА В ОРГАНИЗМЕ РУЧЬЕВОЙ ФОРЕЛИ

Трудно переоценить роль микроэлементов в обмене веществ растущего организма. Об этом свидетельствуют многочисленные опыты со сбалансированными подкормками по микроэлементам. Добавки некоторых микроэлементов к основному рациону сельскохозяйственных животных, главным образом молодняка, являются важным фактором в стимулировании роста и развития животного и тем самым важным средством в повышении производства высококачественной продукции животноводства.

В последние годы получены хорошие результаты при внесении в пруд микроэлементов вместе с кормом. Опыты, проведенные в нашей республике на карпах (И. П. Иозепсон, 1962), на лососях (Е. М. Маликова, Н. И. Котова, 1963) и на форели (Е. Римш, 1963), показали, что внесение в пруд дополнительных доз микроэлементов повышает продуктивность пруда и способствует улучшению физиологического состояния организма и качества рыбы.

Мы сосредоточили наше внимание на изучении организма форели в связи с тем, что развитие форелеводства в Латвийской ССР является весьма перспективной и актуальной задачей рыбного хозяйства (В. Эггерт, 1963).

В литературе нет достаточных сведений как о нормальном содержании и распределении микроэлементов в организме форели, так и об изменениях этих распределений с возрастом.

В этих двух направлениях проводились наши опыты.

Методом спектрального анализа определяли микроэлементы железо, медь и марганец в органах форели.

Объектом исследования была ручьевая форель *Salmo trutta morpha fario* из бассейнов Венты, Гауи и Ужавы. Сбор материала производился в вегетационный период 1962 г. Результаты обработаны статистически. Всего обработано 82

особи форели разного возраста (от 1+ до 4+ лет). В таблице 1 даны средние показатели веса и длины (*l*) объектов исследования.

Микроэлементы определялись в мышцах, печени, жабрах и гонадах (♀ и ♂).

Таблица 1

Средние показатели длины (в *см*) и веса (в *г*) исследованных рыб

Возраст	Длина в *см*	Вес в *г*	Колич. шт.
1+	8,0	29,0	5
2+	16,4	117,5	37
3+	19,2	175,3	16
4+	26,1	371,3	24

В таблице 2 представлены данные по количественному содержанию микроэлементов железа, меди и марганца в некоторых органах форели в возрастном аспекте. Как и следовало ожидать, печень оказалась более богатой изучаемыми микроэлементами, по сравнению с мышцами и жабрами, и, по-видимому, выполняет функцию микроэлементного депо, подобно тому, как у других видов рыб и животных (А. Войнар, 1960). Железа в мышцах, печени и жабрах гораздо больше, чем марганца и меди.

Сравнивая содержание железа, меди и марганца в гонадах разного пола, оказалось, что семенники значительно уступают яичникам.

Наконец, самый большой интерес представляет возрастная динамика микроэлементов во всех исследованных органах.

Так, в гонадах ручьевой форели (таблица 2) происходит непрерывное накопление всех микроэлементов. Увеличение содержания железа, меди и марганца в яичниках четырехлеток, по сравнению с двухлетками, как видно из рисунков 1, 2 и 3, является статистически достоверным, хотя темпы увеличения этих ингредиентов не одинаковы в разных периодах.

Поскольку половое созревание самок наступает и в трехлетнем возрасте, можно было ожидать, что к этому периоду содержание микроэлементов в икре достигнет высокого уровня. И, действительно, количество железа гонад ♀ в возрасте от 1+ до 3+ лет увеличилось более чем в 3 раза, количество меди в 3,5 раза, количество марганца в 9,4 раза, а в возрасте от 3+ до 4+ лет количество железа увеличи-

Таблица 2

Содержание железа, меди и марганца в органах ручьевой форели разного возраста

Органы	Микроэлементы											
	железо *мг* % на золу				медь *мг* % на золу				марганец *мг* % на золу			
	возраст											
	1+	2+	3+	4+	1+	2+	3+	4+	1+	2+	3+	4+
Мышцы	11,5	54,3	40,7	64,9	2,8	2,1	2,4	3,0	1,9	2,2	2,3	2,8
Печень	734,0	600,6	783,0	655,9	542,0	388,9	325,6	302,5	29,8	30,8	28,9	51,2
Жабры	105,9	200,1	178,4	335,5	3,3	5,0	4,5	5,7	14,9	22,1	28,2	30,1
Гонады ♀	86,6	261,3	278,5	351,7	19,0	50,4	66,3	66,4	9,2	80,3	86,9	114,6
Гонады ♂	13,7	17,5	18,8	30,7	—	30,1	34,9	36,4	7,7	27,0	27,8	30,8

лось всего на 26%, медь вовсе не увеличилась, а марганец увеличился на 32%. Таким образом, к моменту половозрелости ♀ (3+лет) количество микроэлементов в гонадах приближается к максимальному.

Что касается семенников, то возрастные изменения носят здесь иной характер. Из рисунков 1, 2 и 3 видно, что увеличение микроэлементов в возрасте от 2+ до 4+ лет статистически достоверно только для железа. Это, по-видимому, связано с тем, что самцы, достигая половой зрелости иногда

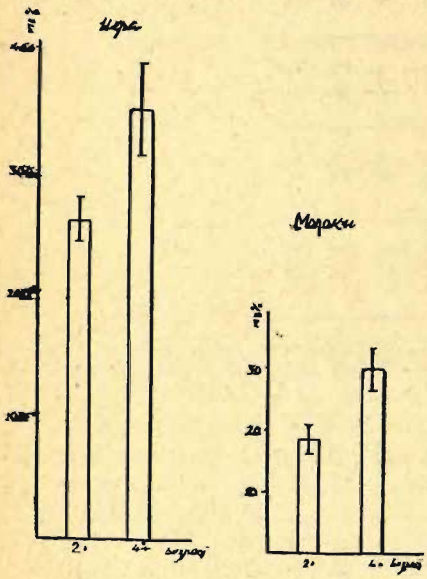


Рис. 1. Динамика содержания железа в гонадах форели.

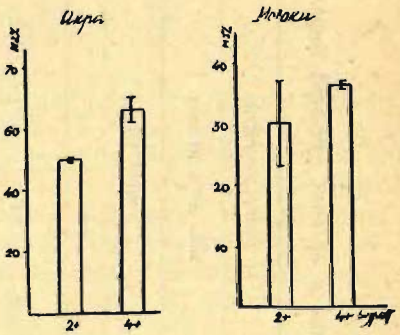


Рис. 2. Динамика содержания меди в гонадах форели.

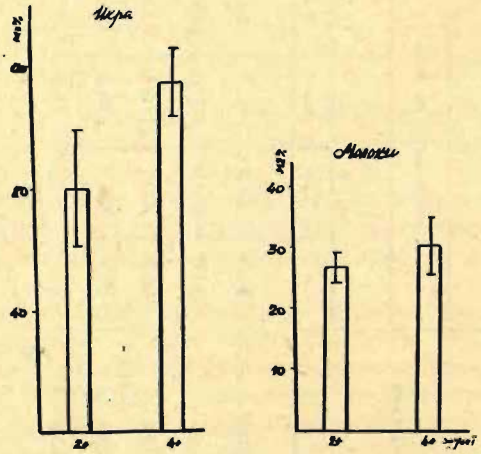


Рис. 3. Динамика содержания марганца в гонадах форели.

уже на втором году, концентрируют в этом возрасте в молоках большое количество микроэлементов. Например, содержание меди с 2+ до 4+ лет увеличилось всего на 21%, с 3+ до 4+ лет на 4—5%; содержание марганца — с 2+ до 4+ лет на 14%, с 3+ до 4+ лет на 10%, а с 1+ до 2+ лет в 3,5 раза. Это подтверждает наше предположение о накоплении жизненно важных биологически активных микроэлементов в икре и молоках к моменту их созревания.

Наряду с возрастным увеличением микроэлементов в гонадах наблюдается повышение количества микроэлементов почти во всех обследованных органах ручьевой форели в периоде от 1+ до 4+ лет. Исключение представляет печень для железа и меди. Стало быть печень как депо тяжелых металлов, является основным источником, снабжающим половые продукты к моменту их созревания медью и железом.

Однако печень не является единственным органом, депонирующим микроэлементы. Известную роль здесь играют мышцы. Поэтому и происходит перераспределение микроэлементов между органами в разных периодах роста и развития организма. Из таблицы 2 видно, что в возрасте от 1+ до 2+ лет содержание железа в печени уменьшается, а в мышцах возрастает, с 2+ до 3+ лет, наоборот, в печени возрастает.

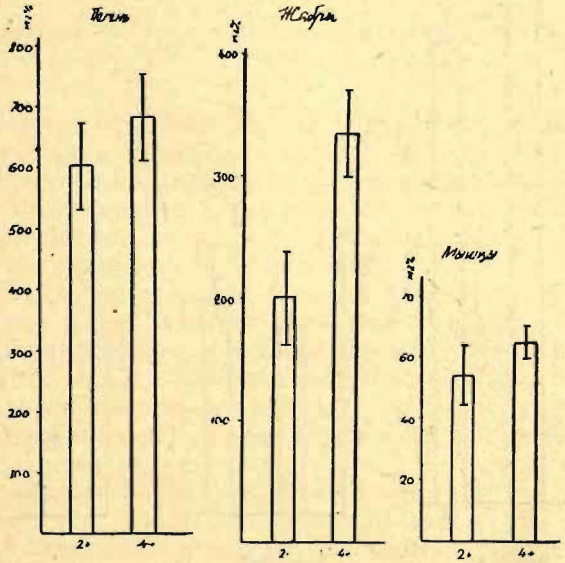


Рис. 4. Возрастная динамика железа в печени, жабрах и мышцах форели.

а в мышцах уменьшается и, наконец, в возрасте от 3+ до 4+ лет опять в мышцах возрастает, а в печени уменьшается. Очевидно, такая подвижность в перераспределении железа является причиной того, что увеличение количества железа, которое нам удалось наблюдать в печени и мышцах в возрасте от 2+ до 3+ лет (рис. 4), статистически не достоверно.

Медь в печени снижается до 4+ лет непрерывно и в большой степени (табл. 2), как об этом убедительно свидетельствует рисунок 5. В то же время содержание меди в мышцах, хотя и очень незначительно, но увеличивается.

Интересно, что исследования, проведенные на детях, в какой-то мере подтверждают наши результаты. Л. И. Лапин и др. (1962) утверждают, что, несмотря на имеющийся запас меди и железа к моменту рождения, дети в возрасте 5—6 месяцев жизни испытывают острую нужду в указанных микроэлементах. Баланс меди и железа у детей находится в

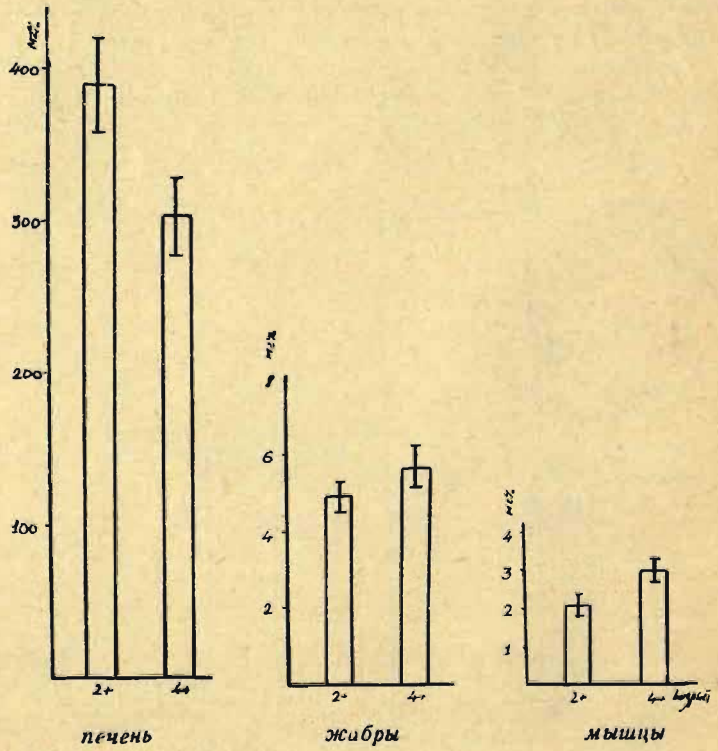


Рис. 5. Возрастная динамика меди в печени, жабрах и мышцах форели.

прямой зависимости от возраста. То же можно сказать и о форели, хотя факторы, регулирующие содержание микроэлементов в организме детей и рыб, разные. Изменение содержания меди и железа в организме детей связывают главным образом с рационом ребенка, переходом от молочного питания на искусственное и т. д. У рыб же микроэлементный баланс определяется как осмотическим проникновением, так и поступлением в организм через пищевые цепи.

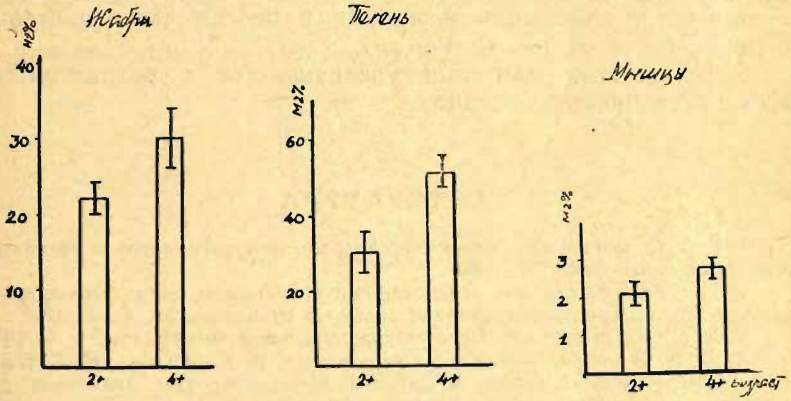


Рис. 6. Увеличение марганца с возрастом в жабрах, печени и мышцах форели.

Что касается марганца, то его содержание увеличивается с возрастом как в мышцах, так в печени и жабрах (рис. 6).

На возрастное увеличение марганца в теле животных, как на общую закономерность, указывает А. Войнар (1960). Наши данные, полученные на примере ручьевой форели, подтверждают эту закономерность и для рыб.

Чрезвычайно интересным с нашей точки зрения является тот факт, что в жабрах увеличиваются с возрастом все указанные микроэлементы, и это увеличение статистически достоверно (рис. 4, 5 и 6). Можно предполагать, что в процессе эволюции функций механизмы, регулирующие уровень биологически важных веществ во внутренней среде, достигли в жабрах большого совершенства, тем более в связи с ответственной физиологической ролью этих органов.

Известно, что жабры принимают большое участие в обмене макроэлементов между организмом и средой (Коштоянц Х. С., 1951), но их роль в обмене микроэлементов, к сожалению, почти не изучена.

ВЫВОДЫ

1. Содержание микроэлементов железа, меди и марганца в органах форели (мышцах, печени, жабрах, гонадах) изменяется с возрастом.

2. В гонадах увеличивается содержание железа, меди и марганца с возрастом и достигает высокого уровня к моменту половозрелости.

3. В жабрах непрерывно возрастает содержание железа, меди и марганца в периоде роста от 1+ до 4+ лет.

4. Содержание меди и железа в печени уменьшается в периоде роста от 1+ до 4+ лет.

5. Количество марганца увеличивается с возрастом во всех исследованных органах.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. О. Войнар. Биологическая роль микроэлементов в организме животных и человека. М., 1960.
2. И. П. Йозепсон. Значение микроэлементов для выращивания молоди карпа. Труды конференции молодых специалистов. Рига, 1962.
3. Х. С. Коштоянц. Основы сравнительной физиологии, ч. 1, 1951.
4. Л. Н. Лапин, Б. Х. Караходжаев, И. Г. Приев, И. В. Бретун. Обмен меди и железа у детей и применение этих элементов для лечения анемии в детском возрасте. Микроэлементы в сельском хозяйстве и медицине, 1962.
5. Е. М. Маликова, Н. И. Котова. Массовое выращивание молоди лосося до покатной стадии в сокращенные сроки. Рыбное хозяйство № 2, 1963.
6. Э. Римш. Азотистый обмен и оценка физиологического состояния молоди радужной форели в зависимости от качества корма. Диссертация, 1963.
7. В. Эггерт. Форелеводство в Латвийской ССР. Рыболовство и рыбоводство, № 6, 16—17, 1963.

S. BEHRMANN, A. SIEDINA

DIE DYNAMIK DER SPURELEMENTE DES EISENS, KUPFERS UND MANGANS BEI DER BACHFORELLE IN ABHÄNGIGKEIT VOM ALTER

ZUSAMMENFASSUNG

Objekte der Untersuchung war die Bachforelle Salmo trutta morpha fario, aus den Stromgebieten der Venta, Gauja und Ushawa LSSR. Es wurde der Gehalt von Spurelementen des Eisens, Kupfers und Mangans in den Muskeln, der Leber, den Kiemen und den Gonaden bei Individen beiderlei Geschlechts

im Alter von 1 + bis 4 + Jahren festgestellt. In den Gonaden erfolgt eine erhöhte Aufspeicherung der Spurelemente bis zur Erreichung der Geschlechtsreife und Ausreifung der Keimzellen. Besonders reich an Spurelementen ist die Leber, welche augenscheinlich als Depot dient, von wo aus die Keimzellen in Moment ihrer Ausreifung mit Kupfer und Eisen versorgt werden. Eine gewisse Rolle bei der Verteilung von Spurelementen spielen auch die Muskeln. Der Gehalt an Mangan vergrößert sich mit dem Alter in allen Organen der Bachforelle. In den Kiemen, einem ausschließlich physiologisch aktiven Organ, wurde eine erhöhte Aufspeicherung auch von Eisen und Kupfer während der ganzen Reifungsperiode beobachtet.

УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ ЛАТВИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА им. П. СТУЧКИ, т. LXVII. 1965. ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И БИОХИМИЯ, № 4

А. ИЛЗИНЯ

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА МИКРОЭЛЕМЕНТОВ (меди, марганца, железа и цинка) В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ ПЛОТВЫ ИЗ ОЗЕР БУРТНИЕКУ И РУШОНУ

Многие обитатели вод, особенно морей, являются биологическими концентраторами отдельных микроэлементов (А. П. Виноградов, 1938, 1944). В литературе имеются некоторые данные о содержании и динамике микроэлементов в организме рыб (М. И. Сканави-Григорьева, 1939, А. А. Адамова и др., 1949, Е. А. Боровик и М. В. Терентьева, 1963, T. Mori, M. Saiki, 1956 и др.). Однако роль рыб в круговороте микроэлементов водной среды мало изучена.

Учитывая биологическое значение микроэлементов марганца, меди, железа и цинка в важнейших физиологических процессах организма, мы поставили задачу проследить, во-первых, за распределением этих микроэлементов в органах и тканях плотвы из двух озер Латвийской ССР — Буртниеку и Рушону, во-вторых, — за сезонной динамикой микроэлементов в организме плотвы.

I. ХАРАКТЕРИСТИКА ОЗЕР БУРТНИЕКУ И РУШОНУ

Озеро Буртниеку находится в северной части ЛССР и является одним из крупнейших озер республики с площадью 3836 га. Это мелкое (максимальная глубина 3,3 м, средняя — около 2 м) евтрофное плотвично-лещевое озеро, которое в последнее время все больше превращается в плотвичное. Гидрохимический режим озера благоприятен для жизни рыб, особенно карповых (I. Lablaika, 1962. g.).

Озеро Рушону расположено на Латгальской возвышенности в восточной части ЛССР, имеет площадь 2313 га. Группа островов и полуостровов разделяет озеро на две разные части. Просторная западная часть, в которой был собран наш материал, с наибольшей глубиной около 8 м, по гидробиологической характеристике является евтрофной.

По систематике, данной Н. А. Мосевичем и А. Я. Кумсаре (1955 г.), озера Буртниеку и Рушону относятся к III группе озер Латвийской ССР, т. е. к мелким озерам со средней глубиной менее 5 м. Эти озера являются хорошо облавливаемыми, имеют большое промысловое значение, особенно озеро Буртниеку. В озерах III группы иловые отложения развиты сильнее, чем в озерах I и II групп. Озера более богаты кормами, в особенности зообентосом, имеют густые заросли водных растений и водорослей — элодей, хар и др. Именно эти объекты (зообентос, водоросли и водные растения) составляют основную массу пищи плотвы (I. Lablaika, 1962. g., Gerdens, 1964. g.,В. Желтенкова, 1949 г.).

Судя по картограммам, составленным в лаборатории биохимии почв и микроэлементов Института биологии АН ЛССР (Dz. Beriņa, 1961. g., Н. Н. Иванова, 1956 г.), почва районов озер Буртниеку и Рушону содержит разные количества микроэлементов марганца, меди и цинка (см. рисунки 1, 2, 3).

Из этих картограмм следует, что почва района, где расположено озеро Буртниеку (обозначено цифрой I), содержит меньше марганца — 45 *мг/кг,* чем почва окрестностей озера Рушону (обозначено цифрой II), где содержание марганца 60 *мг/кг.*

В отношении меди картина другая — в Валмиерском районе, где озеро Буртниеку, почва содержит от 2,0—4,6 *мг/кг* меди, а содержание меди в почвах Латгальской возвышенности ниже — 1,8—3,0 *мг/кг.*

Содержание цинка в почвах района озера Рушону достигает всего от 1,0 до 2,6 *мг/кг.* Картограмма по содержанию цинка в Валмиерском районе пестрая, но преобладают почвы с содержанием цинка от 2,5 до 12 *мг/кг.*

II. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования мы выбрали плотву *Rutilus rutilus* L.

Ввиду сравнительно медленного темпа роста и качества мяса плотва не относится к высококачественным промысловым рыбам. Существенным является то обстоятельство, что во многих озерах нашей республики плотва составляет до 50% общего улова. Так, в озере Рушону за последние 10 лет улов плотвы составлял 29,8% общего улова, а в озере Буртниеку — даже 72,7% (Я. Я. Слока, 1964 г.).

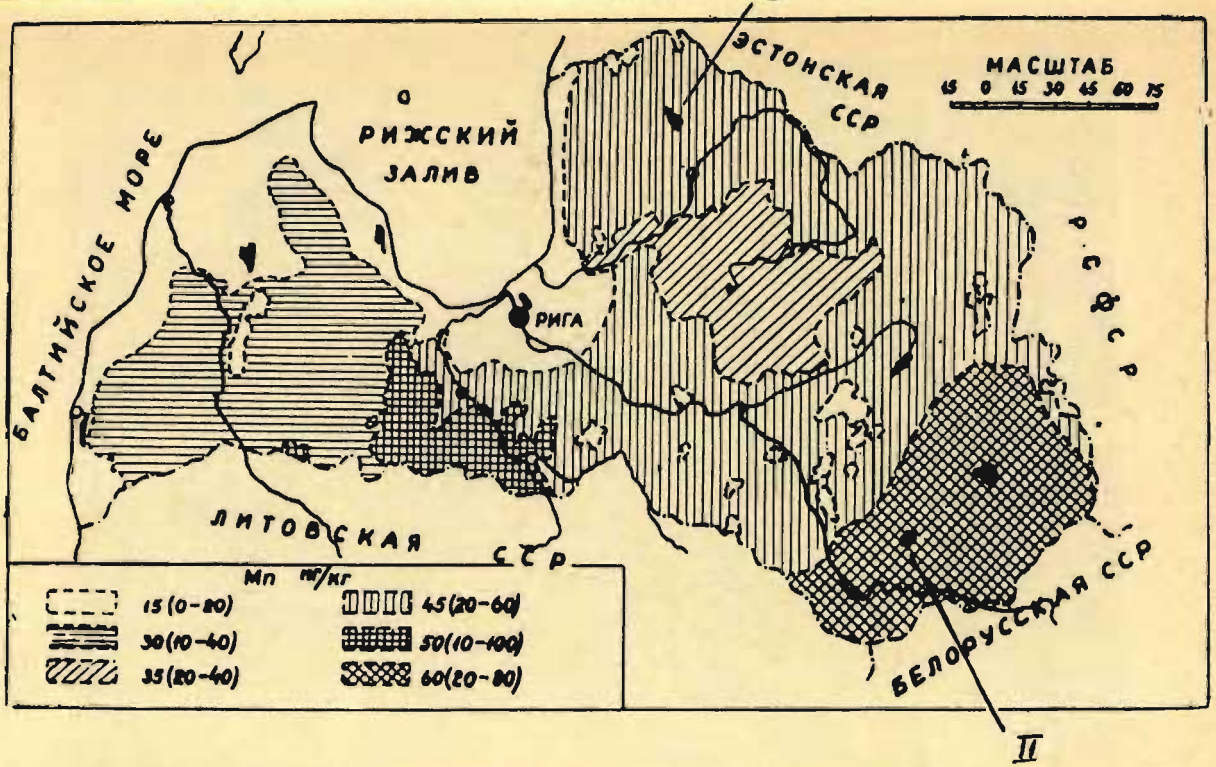


Рис. 1. Содержание марганца в почвах Латвийской ССР.

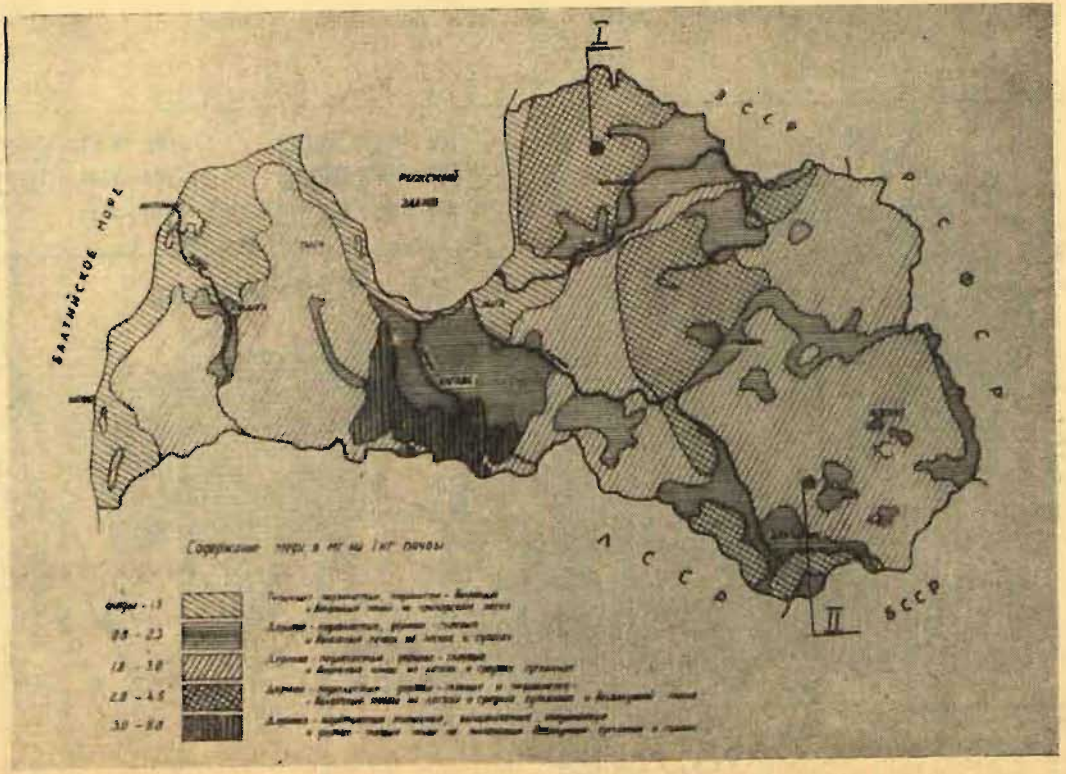


Рис. 2. Содержание меди в почвах Латвийской ССР

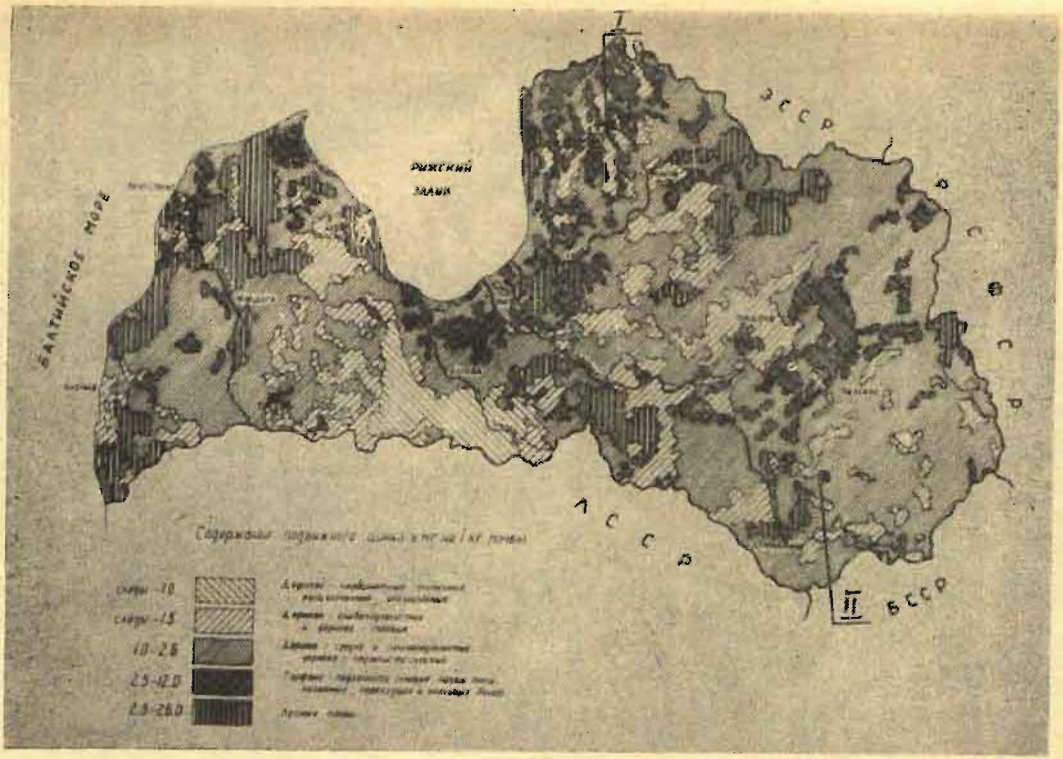


Рис. 3. Содержание цинка в почвах Латвийской ССР.

Состав пищи плотвы разнообразен. В первые годы жизни плотва в основном является планктонофагом, а начиная с четвертого года жизни основную массу пищи плотвы составляют водоросли и водные растения (элодеи, хары) и зообентос (моллюски, личинки насекомых).

Состав пищи у плотвы существенно меняется по сезонам. Так, в мае 1963 г. в пищевом тракте плотвы из озера Рушону чаще всего встречались водоросли и водные растения — в 93,8% случаев, а личинки ручейников — всего в 31,8% случаев. Значение моллюсков в пище плотвы в этом месяце незначительно. Они встречались лишь у 17,5% рыб, среднее количество экземпляров в одном пищевом тракте — 0,87. В августе 1963 г. у плотвы из озера Рушону доминирует пища животного происхождения, и первое место занимают моллюски — в 57,7% случаев, среднее количество экземпляров в одном пищевом тракте — 5,74. Доминируют *Valvata piscinalis, Valvata cristata, Bithynia tentaculata.* Водоросли и водные растения занимают второе место — встречаются у 42,8% рыб, а личинки ручейников — у 35,7% рыб (V. J. Gerdens, 1964. g.).

Можно отметить, что элодеи, хары и перечисленные представители зообентоса отличаются высоким содержанием микроэлементов, главным образом железа и марганца (А. Э. Илзиня, 1964). Самая разнообразная пища плотвы озера Буртниеку также в июле и августе месяцах (I. Lablaika, 1962). Этим обстоятельством объясняют наиболее быстрый прирост живого веса плотвы именно в этих месяцах (М. В. Желтенкова, 1949, Б. М. Мединков, 1962).

Учитывая особенности питания плотвы в течение вегетационного периода, мы брали для анализов из обоих озер плотву в два периода 1963 года — весной (в мае месяце) и в конце лета (в августе месяце).

Общее число проанализированных рыб — 111, из озера Буртниеку — 45, из озера Рушону — 66.

У каждой плотвы измерялась наибольшая длина («*L*»), а также длина до конца хвостового стебля («*l*»), определялся вес («*Q*»), пол, стадия развития гонад. Эти данные использовались для группировки плотвы. Каждую группу комплектовали из 3—10 особей одного размера и пола.

Таких групп было всего 19, возрастной состав от 4+ до 8+, т. е. плотвы, достигшие половозрелости, т. к. в нашей республике плотва впервые нерестится в возрасте 4—5 лет (V. Gerdens, 1964).

Для определения микроэлементного состава (Cu, Mn, Fe, Zn) в печени, яичниках, мышцах, почках, желчи, жаберных

дугах, костях и чешуе плотвы исследовались параллельно 2—3 средние пробы из каждой группы плотв.

Микроэлементы марганец, медь, железо и цинк определялись методом количественного спектрального анализа (описание метода см. в статье А. Э. Илзинь в данном сборнике).

III. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследования проводились нами в нескольких направлениях. Изучались распределение марганца, железа, меди и цинка в органах и тканях плотвы, также динамика микроэлементов в организме рыб в зависимости от сезона (весенний и летний периоды). Кроме того, сравнивалось содержание микроэлементов марганца, меди, железа и цинка в мышцах и печени плотвы из разных водоемов ЛССР (озера Буртниеку и Рушону).

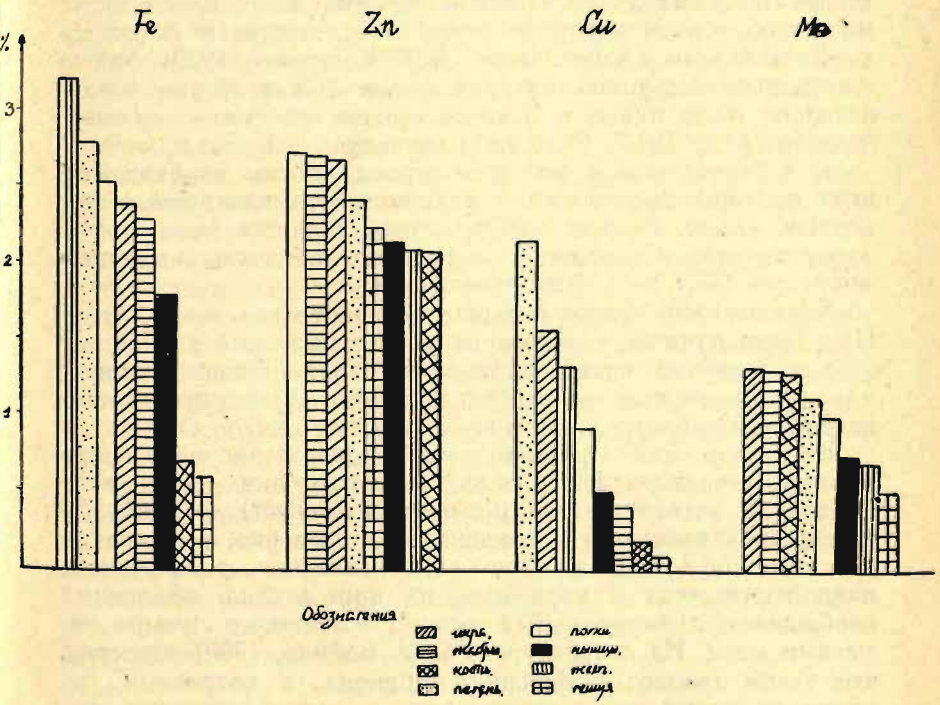


Рис. 4. Содержание микроэлементов железа, цинка, меди и марганца в органах и тканях плотвы (логарифм *мг* % на золу)

На рисунке 4 (логарифмическая шкала) показаны средние данные по содержанию четырех микроэлементов в органах и тканях плотвы из озер Буртниеку и Рушону.

Из рисунка 4 видно, что органы и ткани плотвы содержат разное количество железа, цинка, меди и марганца.

Для организма плотвы характерно высокое содержание железа. Так, желчь в среднем содержит 1650 *мг*%, печень — 562,7 *мг*% железа от общей массы золы. Также почки, икра, жаберные дуги сравнительно богаты железом. Исключение представляют кости и чешуя, где концентрация железа очень низка — соответственно 5,0 *мг*% и 3,7 *мг*% общей массы золы.

Содержание цинка в организме рыб, подобно железу, также высокое, но в отличие от железа нет резко выраженной разницы между количеством цинка в разных органах и тканях. Из проанализированных нами объектов не было таковых, где соедржание цинка ниже 100 *мг*% общей массы золы. Высокие концентрации цинка свойственны почкам, также жаберным дугам. Накопление цинка в жаберных дугах можно объяснить в первую очередь присутствием фермента карбоангидразы в этом органе (А. Х. Коштоянц, 1950). Много цинка содержат также яичники и печень, как органы. Сравнительно мало цинка в мышцах, чешуе, костях — соответственно 141,2; 183,7; 177,0 *мг*% на золу.

Колебания меди в разных органах плотвы характеризуются широким диапазоном. У рыб, подобно теплокровным животным (А. О. Войнар, 1960), печень является депо микроэлемента меди. Содержание меди в печени плотвы в среднем достигает 147,7 *мг*% общей массы золы.

Яичники рыб также содержит относительно много меди. По нашим данным, содержание меди в икре рыб зависит от стадии развития икры, достигая в преднерестовый период максимального количества. Это наглядно иллюстрируют приведенные в таблице 5 данные.

Во второй стадии развития (май) содержание меди в икре плотвы характеризуется низким показателем — 6,4 *мг*% на золу, в четвертой стадии развития (август) — содержание меди в икре рыб увеличивается, примерно, в 10 раз и достигает 68,8 *мг*% на золу. Биологическая роль такого накопления меди в икре рыб, на наш взгляд, объяснима снабжением личинки рыб в период желточного пузыря запасами меди. Из литературы (А. О. Войнар, 1960) известно, что такой процесс снабжения эмбриона в натальном периоде запасами меди имеет место у млекопитающих животных. Из наших данных следует, что подобная закономерность наблюдается также у рыб.

Таблица 5

Динамика микроэлементов марганца, железа, меди и цинка в органах и тканях плотвы в зависимости от сезона (в *мг* % на золу)

№№ п/п	Органы и ткани	Mn		Fe		Cu		Zn	
		Время взятия пробы							
		май	август	май	август	май	август	май	август
1	Мышцы	3,1	7,6	36,3	76,7	3,2	3,6	116,2	166,1
2	Печень	14,9	18,9	512,9	612,4	110,5	184,8	180,2	245,3
3	Яичники	10,9	32,4	94,6	407,4	6,4	68,8	310,4	646,1
4	Жаб. дуги	15,9	24,8	156,9	231,0	1,7	3,3	325,2	643,0
5	Кости	15,9	24,1	3,4	6,7	1,3	2,4	157,2	197,0
6	Чешуя	3,4	3,6	1,9	5,5	0,4	0,6	150,7	216,7
7	Почки	9,5	16,7	263,0	436,8	6,0	10,0	416,9	380,2
8	Желчь	4,0	4,3	1000,0	1650,0	24,0	35,4	100,0	202,5

В большинстве исследованных нами органов и тканей (мышцы, жаберные дуги, кости, чешуя, почки) содержание меди едва достигает 10 *мг*% общей массы золы. Как видно из рисунка 4, уровень содержания меди в организме рыб значительно ниже, чем железа и цинка.

Распределение марганца в органах и тканях рыб более равномерное, чем железа и меди, не наблюдается органов, резко выраженных накопителей этого микроэлемента. Однако, если жаберные дуги и кости содержат около 20 *мг*% марганца из общей массы золы, то концентрация марганца в мышцах и чешуе не превышает 7,6 *мг*%.

Из рисунка 4 следует, что в наибольших количествах Mn, Cu, Fe и Zn содержат органы с активно протекающими процессами метаболизма — печень, гонады, жаберные дуги, а также органы и ткани, связанные с экскрецией (почки, желчь). Особенно много в желчи железа (до 1,5%) и меди (35,4 *мг*%), но мало марганца (4 *мг*%).

Сравнительно мало Mn, Cu, Fe и Zn в мышцах рыб. Но, учитывая большую массу мышц, по сравнению с другими органами и тканями, первую также можно считать микроэлементным депо.

Низкое содержание микроэлементов в чешуе можно объяснить невысоким уровнем процессов метаболизма. Чешуя является лишь покровом тела.

Результаты анализов содержания микроэлементов марганца, железа, меди и цинка в органах и тканях плотвы в зависимости от сезона показаны в таблице 5.

Из таблицы 5 следует, что все органы и ткани рыб содержат значительно больше микроэлементов в августе, чем весной — в мае месяце. Исключение представляют почки по содержанию цинка.

Сезонную динамику микроэлементов в теле плотвы можно объяснить следующе.

Во-первых, в мае месяце плотва для анализов из обоих озер бралась сразу после нереста. В преднерестовый период, очевидно, происходило перераспределение микроэлементов между органами и тканями рыб — в икре рыб увеличилась концентрация меди и железа, а также марганца и цинка за счет снижения количества этих микроэлементов в других органах и тканях, служащих в какой-то мере микроэлементным депо. Такие сведения имеются в литературе (Mario Tadao, Suzuki Akimi, 1957), и это вытекает из полученных нами данных.

Во-вторых, в июле и августе месяцах плотва из озер Буртниеку и Рушону потребляет самую разнообразную пищу (V. Gerdens, 1964. g., I. Lablaika, 1962. g.). Это обусловливает наиболее быстрый прирост живого веса плотвы именно в июле и августе. На зависимость между составом пищи и темпами роста указывают М. В. Желтенкова (1949 г.) и Б. М. Медников (1962 г.).

По-видимому, в этом периоде наряду с органическими веществами в теле плотвы накапливаются также минеральные, в том числе и микроэлементы в оптимальных для организма количествах. О сезонной динамике микроэлементов в организме рыб свидетельствуют результаты А. А. Адамовой, А. Г. Босика и др. (1949).

Обработав материал по содержанию микроэлементов меди, марганца, железа и цинка в органах и тканях плотвы из двух озер нашей республики, мы могли подойти к решению последней задачи — охарактеризовать влияние биогеохимической среды на микроэлементный состав организма рыб.

Из рисунка 5 видно, что печень плотвы из озера Буртниеку содержит больше марганца, больше меди, больше железа и больше цинка, чем печень плотвы из озера Рушону. Та же закономерность наблюдается и в отношении мышечной ткани, за исключением цинка, содержание которого в мышцах плотвы из озера Рушону большее.

Причинами различного содержания микроэлементов в теле плотвы из двух озер могут быть, во-первых, влияние микроэлементного состава почвы, более богатого в районе оз. Буртниеку по меди и цинку, во-вторых, — влияние более богатого корма (зообентоса) в озере Буртниеку по

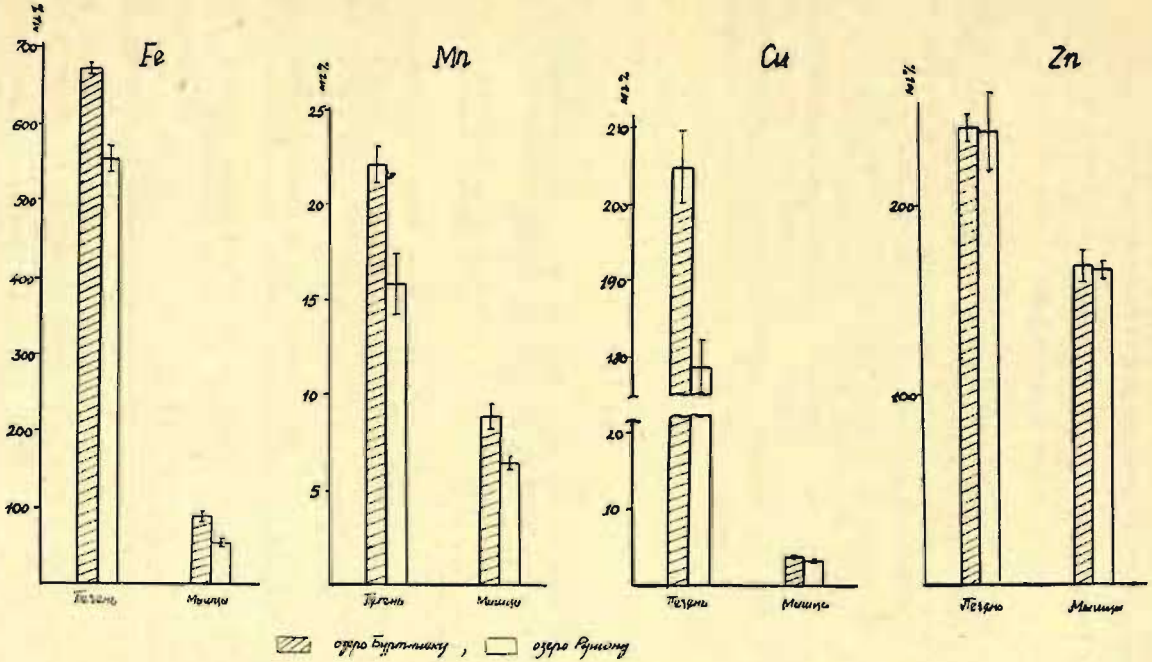


Рис. 5. Содержание микроэлементов железа, марганца, меди и цинка в мышцах и печени плотвы из озер Буртниеку и Рушону (в *мг* % на золу).

сравнению с озером Рушону (Dz. Vadze, 1963). Лучшая кормовая база, богатая микроэлементами, благоприятствует более быстрым темпам роста плотвы из озера Буртниеку по сравнению с плотвой из озера Рушону.

ВЫВОДЫ

1. Органы и ткани рыб отличаются по своему микроэлементному составу. В наибольших количествах Cu, Mn, Fe и Zn содержат печень, икра, жаберные дуги и. желчь, относительно меньше микроэлементов в мышцах и чешуе.

2. Наблюдается сезонная динамика изучаемых микроэлементов в органах и тканях рыб. Содержание Cu, Mn, Fe и Zn во всех обследованных органах и тканях в конце вегетационного периода (август) значительно выше, чем весной (май).

3. В мышцах и печени плотвы из озера Буртниеку содержание микроэлементов выше по сравнению с плотвой из озера Рушону.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. А. Адамова, А. Г. Босик, М. И. Воскобойникова, О. И. Твердышева. Естественное содержание микроэлементов в рыбах Баренцова моря. Гигиена и санитария, 11, 1949.

2. Е. А. Боровик, М. В. Терентьева. О содержании некоторых микроэлементов в икре радужной форели *(Salmo Grridens Gibbons)*. Доклад АН БССР, т. 7, № 10, 1963.

3. А. И. Войнар. Биологическая роль микроэлементов в организме человека и животных. 1960, М.

4. М. В. Желтенкова. Состав пищи и рост некоторых представителей *Ruttilus rutilus L.* Зоологический журнал, т. XXVIII, вып. 3, 1949.

5. Н. Н. Иванова. Содержание меди и цинка в почвах Латвийской ССР. Диссертация на соискание ученой степени канд. с/х наук. Рига, 1956.

6. А. Э. Илзинь. Минеральный состав плотвы и леща и их пищевых объектов из озер Буртниеку и Рушону Латвийской ССР. XI Научная конференция по изучению внутренних водоемов Прибалтики. Тезисы докладов. Петрозаводск, 1964.

7. Х. С. Коштоянц. Основы сравнительной физиологии. Том I. 1950.

8. Б. М. Медников. Биологическая разнокачественность кормовых организмов как фактор, определяющий рост рыб и состав промысловых комплексов. Вопр. ихтиологии, Т. 2, вып. 2, 1962.

9. Н. А. Мосевич, А. Я. Кумсаре. Современное рыбопромысловое значение озер Латвийской ССР и перспективы их дальнейшего рыбохозяйственного использования. Рыбное хоз. внутр. вод Латв. ССР, 1, 1955.

10. М. И. Сканави-Григорьева. К вопросу о химическом элементарном составе рыб. Труды биогеохимической лаборатории АН СССР, т. V, 1939.

11. Я. Я. Слока. Характеристика современного уровня развития и принципы существующего размещения рыбного хозяйства внутренних вод Латвийской ССР, 1964 (рукопись).

12. Dz. Beriņa. Mangāna formas un dinamika Latvijas PSR augsnēs. Disert lauks. zin. kandidāta grāda iegūšanai. Rīgā, 1961.

13. V. J. Gerdens. Rušonu ezera raudas bioloģija. Diplomdarbs. Rīga, 1964.

14. I. Lablaika. Burtnieku ezera zivis, to bioloģija un nozvejas. Disert. bioloģ. zin. kand. grāda iegūšanai. Rīgā, 1962.

15. Dz. Vadze. Rušonu ezera zoobentosa rezerves. LPSR ZA Vēstis, Nr. 7, 1963.

16. T. Mori and M. Saiki. Studies on the Distribution of Administerd Radioactive zinc in the Tissues of Fishes. Research in the Effects and Influonces of the Nucleor Bomb. Test Expositions II, Tokio 1956.

17. Suzuki Akimi, Mario Tadao. Взаимосвязь между созреванием Mareesoda, Auxis tapersoma (Blecker и содержанием в их организме Fe, Cu Zn. Rept. Nankei Reg. Fish. Res. Laboratory Nr. 6, 1957. (на японском языке). Цит. из реф. журнала Биохимия, № 5, 5529, 1959.

A. ILZINA

THE SEASONAL DYNAMIC OF TRACE ELEMENTS (Copper, Manganese, Iron and Zinc) IN THE ORGANS AND TISSUES OF THE ROACH FROM THE LAKES OF BURTNIEKI AND RUSHONU.

SUMMARY

It has been found that there is difference in the content of trace elements copper, manganese, iron and zinc in the organs and tissues of the roach. The content of trace elements is high in the liver, spawn, gills and gall bladder, but comparative low in the muscles and scales.

Towards the end of the vegetation period (August), the content of copper, manganese, iron and zinc is considerabely more in all the analysed organ and tissues of the roach than in spring (May).

In the muscles and liver of the roach from the lake of Burtnieki the content of trace elements is higher than ir the corresponding organs of the roach from the lake of Rushonu.

УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ ЛАТВИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА
им. П. СТУЧКИ, т. LXVII. 1965. ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И БИОХИМИЯ, № 5

Э. ЛАНГЕ

ВЛИЯНИЕ ЦИНКА НА ФАГОЦИТАРНУЮ РЕАКЦИЮ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ РЫБ

И. И. Мечников (1950) указывает на фагоцитарную реакцию как на существенный фактор физиологического иммунитета, развивающийся в процессе эволюции, в процессе приспособления животного организма к внешней среде.

У всех высших позвоночных животных при инфекции развиваются целлюлярная и гуморальная защитные реакции. То же самое наблюдается и у рыб (Pliszka F., 1938). Благодаря защитной реакции увеличивается сопротивляемость организма рыб к болезням.

К числу факторов, способных повышать защитные свойства животного организма, относятся также микроэлементы. Однако влияние микроэлементов на фагоцитарную функцию лейкоцитов крови рыб совсем мало изучено.

Мы поставили задачу выяснить, в какой мере добавочное введение микроэлементов в организм рыб изменит фагоцитоз лейкоцитов.

В настоящей статье излагаются результаты влияния цинка на фагоцитарную реакцию лейкоцитов периферической крови рыб. Известна способность цинка изменять фагоцитарную функцию лейкоцитов у разных животных (March F., 1933; Черкасова Е. В., 1956; Ланге Э. Р., 1961; Кошик Т. Ф., 1964).

Микроэлемент цинк поступает в организм рыб из воды через поверхность тела (Берман Ш., Илзинь А., Лиепниеце М., 1961) и с пищей.

Существенное значение для обеспечения физиологического эффекта микроэлементов имеет не только концентрация вводимого раствора, а также путь его введения в организм (Черкасова Е. В., 1962).

В наших опытах влияние микроэлемента цинка на фагоцитарную реакцию лейкоцитов крови рыб исследовалось при добавлении его к воде, при пероральном и парентеральном введении в организм рыб.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Опыты ставились на карпах и карасях. Всего проведены 3 серии опытов. В первой серии цинк добавлялся к воде, во второй — вводился в организм рыб перорально, в третьей — парентерально.

В каждой серии кроме подопытных групп была одна контрольная группа, которая не получала добавок цинка. Рыбам контрольной группы второй и третьей серий вместо цинка вводили раствор хлористого натрия. Во всех случаях вводили в организм или добавляли к воде микроэлемент в форме хлористого цинка, так как различные формы соединений металлов и неметаллов оказывают различное влияние на развитие защитных сил животного организма (Казанов Х. Ш., Левина Д. Н., 1963).

Ввиду того, что резкое колебание температуры воды изменяет фагоцитарную реакцию рыб (Шубина А. В., 1959), мы держали рыб в течение 4—5 дней перед опытом в аквариумах при такой температуре, которая необходима для эксперимента. Вода в аквариумах аэрировалась.

Опыты первой серии ставились в январе 1963 г. на 5 группах рыб (вес 13—26 г) по 7—8 экземпляров в каждой группе. Подопытные сеголетки карпа содержались в воде при температуре 10,5—11,0°С без подкормки. Первые 4 группы были помещены в аквариумы с раствором хлористого цинка из расчета 5, 25, 100 и 500 *мг* на 1 *кг* веса рыбы. Контрольную группу поместили в воду без примеси цинка. У всех групп определяли фагоцитарную реакцию лейкоцитов крови перед опытом и через 6 часов после помещения рыбы в воду с цинком.

Опыты второй серии были поставлены на 32 карасях сеголетках весом 112—187 *г* (3 подопытные группы). В течение 10 дней подопытным рыбам ежедневно перорально вводили 0,005, 5 и 10 *мг/кг* цинка (соответственно 1, 2 и 3 подопытным группам). Контрольная группа получала 5 *мг/кг* хлористого натрия. Рыб содержали в аквариумах при температуре воды 14,5—15,0°С и кормили. Фагоцитоз лейкоцитов определяли перед пероральным введением цинка и через 10 дней после введения.

В опытах третьей серии было использовано 49 карасей. Исследования проводились в августе, январе и марте. Рыбы так же, как и в опытах первой серии, содержались в аквариумах при температуре 10,5—11,0°С. Хлористый цинк в количестве 0,002 (I гр.), 0,05 (II гр.), и 5,0 (III гр.) *мг/кг* вводили рыбам внутримышечно. Фагоцитарную реакцию определяли в начале опыта и через 6 часов после введения цинка.

Кровь для изучения фагоцитоза брали у каждой рыбы из хвостовой артерии дважды. Фагоцитарную интенсивность лейкоцитов определяли методом Н. В. Пучкова и С. М. Титовой (1952). Фагоцитируемым материалом служила заранее приготовленная взвесь частичек кармина в физиологическом растворе, содержащая 20 000 зернышек кармина в *мм*³.

К 0,6 *мл* суспензии кармина прибавляли 20 *мм*³ крови. Смесь крови со взвесью зернышек кармина оставляли при температуре 18,5—19,0°С в течение 1 часа 30 минут. Для прекращения фагоцитоза добавляли 2 капли мышьяковистокислого натрия, содержимое пробирок центрифугировали. Из взвеси готовили мазки, которые высушивали на воздухе, фиксировали в течение 3 мин. метиловым алкоголем, а затем окрашивали в течение 50 сек. 1% водным раствором метиленовой сини.

Под иммерсионным объективом микроскопа подсчитывали количество частичек кармина, встречавшихся в 200 лейкоцитах. Производили подсчет в четырех участках мазка — по 50 лейкоцитов в каждом.

Количество фагоцитируемых частиц в 100 лейкоцитах служили показателем интенсивности фагоцитоза.

Экспериментальные данные обработаны методом вариационной статистики.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Первая серия опытов была посвящена изучению фагоцитарной реакции лейкоцитов крови при помещении рыб в воду, к которой добавлялся хлористый цинк. Полученные результаты представлены на рис. 1.

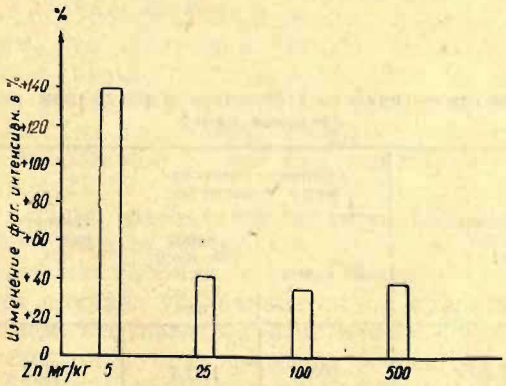


Рис. 1. Изменение интенсивности фагоцитоза лейкоцитов сеголетки карпа в % в зависимости от концентрации цинка в воде.

Интенсивность фагоцитоза перед опытами небольшая (от 22—26), в среднем одинаковая во всех группах. Как видно из рисунка 1, после шестичасового содержания рыб в воде с повышенной концентрацией хлористого цинка интенсивность фагоцитоза лейкоцитов сеголеток карпа увеличивается. Изменения интенсивности фагоцитоза зависят от концентрации цинка в воде. Значительное увеличение фагоцитарной реакции достигается при наименьшей концентрации цинка. Добавка 5 *мг/кг* цинка повышает интенсивность фагоцитоза на 140%, а добавка 25 и 100 *мг/кг* — всего на 40% по сравнению с исходным состоянием. Увеличение интенсивности фагоцитоза статистически достоверно. Высокая доза цинка (500 *мг/кг* цинка) в нашем опыте также увеличивает фагоцитарную интенсивность на 42%.

Фагоцитарная интенсивность лейкоцитов рыб контрольной группы не уменьшалась в течение опыта. Это свидетельствует о том, что повторное взятие крови не изменяет фагоцитарную интенсивность лейкоцитов крови. Отсюда следует, что увеличения интенсивности фагоцитоза лейкоцитов рыб зависят от дозы микроэлемента цинка, добавленного к воде.

В следующей серии опытов исследовалась фагоцитарная интенсивность лейкоцитов рыб при ежедневном введении хлористого цинка через рот. Из таблицы 1 следует, что пероральное введение малых доз хлористого цинка в 1 и 2 опытах несколько повышает фагоцитарную интенсивность, а большая доза цинка (10,0 *мг/кг*) уменьшает фагоцитарную интенсивность лейкоцитов рыб. Однако эффект чрезвычайно мал, и результаты статистически не достоверны. Таким образом, у

Таблица 1

Фагоцитарная интенсивность лейкоцитов карасей при пероральном введении цинка

№ опыта	Доза вводимого агента в *мг/кг*	Средняя интенсивность фагоцитоза		Изменения фаг. инт.	P
		до опыта	через 10 дней после введения		
1	цинк-0,005	108	120,3	+12,3	<0,2
2	цинк-5,0	53	71,8	+18,8	<0,5
3	цинк-10,0	62	49,1	—12,9	<0,5
4	натрий-5,0	119	120,1	+ 1,1	<0,5

нас нет основания считать, что пероральное введение цинка влияет на фагоцитоз рыб.

В третьей серии опытов исследовалась интенсивность фагоцитоза лейкоцитов крови при введении хлористого цинка непосредственно в мышцы. Результаты этих опытов представлены на рис. 2.

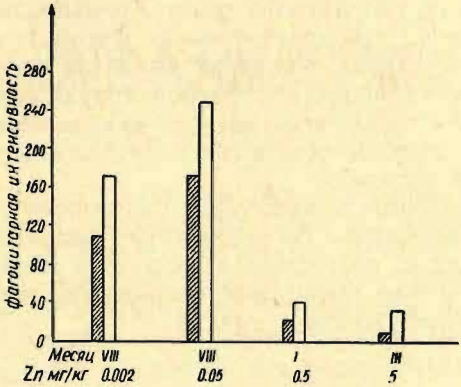


Рис. 2. Влияние внутримышечно введенного цинка на фагоцитарную интенсивность лейкоцитов крови карпа.

Обозначения: заштрихованные столбики — фагоцитарная интенсивность до опыта, светлые — после опыта.

Фагоцитарная интенсивность лейкоцитов рыб перед введением цинка различна. Осенью фагоцитарная интенсивность большая — от 108 до 165. В январе и марте при тех же температурных условиях как осенью фагоцитарная интенсивность очень низка, составляет 8—22, т. к. в опытах использовались рыбы, содержавшиеся продолжительное время в аквариумах без кормления. Известно, что фагоцитарная интенсивность лейкоцитов рыб при голодании обычно понижена (Пучков Н. В., 1951). У рыб параллельной группы, получавших пищу, фагоцитарная интенсивность выше — в среднем колеблется от 53 до 119.

После введения хлористого цинка фагоцитарная интенсивность во всех случаях увеличивается по сравнению с исходным состоянием. Результаты статистически достоверны.

Оказывается, что при введении меньшей дозы цинка (0,002 и 0,05 *мг/кг)* фагоцитарная интенсивность через 6 часов после опыта увеличивается в 1,6 и 1,4 раза, а при введении цинка в дозах 0,5 и 5 *мг/кг,* когда фоновая реакция

фагоцитарной интенсивности низкая, фагоцитоз увеличивается в 2,0 и 4,1 раза.

Таким образом обнаружены изменения фагоцитарной интенсивности лейкоцитов в зависимости от количества введенного цинка и функционального состояния рыб. Больший эффект получен в случаях низкой исходной фагоцитарной интенсивности у голодающих рыб. Концентрация цинка от 0,002 до 5,0 *мг/кг* повышает уровень фагоцитоза у рыб.

В опытах на карпах и карасях выявлена способность микроэлемента цинка повышать фагоцитарную функцию лейкоцитов крови рыб при поступлении микроэлемента цинка в тело рыбы из окружающей воды и при парентеральном введении цинка в организм.

Однако введение цинка через кишечный тракт слабо влияет на фагоцитоз. По-видимому, желудочно-кишечный тракт играет лишь второстепенную роль в обмене минеральных веществ, в том числе микроэлементов, между организмом рыб и их окружающей средой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берман Ш., Илзинь А., Лиепниеце М. Влияние изменения концентраций цинка в воде на некоторые физиологические процессы в организме рыб. Мат. XXI научно-метод. конф., Рига, 162, 1961.

2. Казанов Х. Ш., Левин Д. Н. Электрофоретическое исследование белковой картины крови при введении в организм животных различных форм соединений микроэлементов. Мат. к 3-й Поволж. конф физиол., биох. и фармакол., Горький, 204—205, 1963.

3. Кошик Т. Ф. Вплив сырчанокислого цинку на фагоцитоз у експериментальних травин. Тези доповіасй микроэлементов в биологии и мед., Ивано-Франтиви, 74—75, 1964.

4. Ланге Э. Р. Влияние на фагоцитоз добавления к крови рыб хлористого цинка. Мат. XXI научно-метод. конф., Рига, 159, 1961.

5. Мечников И. И. Избранные биологические произведения, 1950.

6. Пучков Н. В., Титова С. Модификация метода для изучения фагоцитарной активности лейкоцитов. Физ. журн. СССР им. Сеч., т. 38, № 6, 756—757. 1952.

7. Пучков Н. В., Федорова А. Л. Исследование изменения состава крови карпов (Cyprinus carpio) под влиянием голодания и охлаждения. Тр. Мосрыбвтуза, вып. 4, 152, 1951.

8. Черкасова Е. В. Влияние на фагоцитоз добавления к крови растворов хлористого цинка. Тр. Всесоюзн. общ. физиол., биохим., фармакол., т. 3, 100—103, 1956.

9. Черкасова Е. В. Об условиях проявления действия на животный организм цинка как микроэлемента. Тез. док. IV Всесоюзн. сов., Киев, 280, 1962.

10. Шубина А. В. Действие некоторых факторов на фагоцитоз у рыб. Вопр. ихтиол., вып. 13, 1, 1959.

11. Pliszka F., Weitere Untersuchungen über Immunitätsreaktionen

und über Phagozytose bei Karpfen, Zentralblatt Parasit und Infectionskr. Abt. 1, Bd. 145, H 7/8, 451, 1933.
12. March F., Undersogelser over nagle metatsaltes indvikming paa fagocytose, 1933.

E. LANGE

DER EINFLUSS VON ZINK AUF DIE PHAGOZYTOSE DER LEUKOZYTEN IM BLUTE DER FISCHE

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde der Einfluss des Mikroelementes Zink auf die Phagozytose der Leukozyten im Blute der Fische untersucht, indem man es entweder dem Wasser des Aquariums hinzumengte, per os oder parenteral in den Organismus der Fische einführte. Das Zink ändert die Phagozytose der Leukozyten im Blute des Karpfen und der Karausche. Die phagozytäre Intensität hängt von der Menge des zugefügten Zinks und von dessen Einführungswegen in den Organismus ab.

Die Konzentrationserhöhung des Zinks im Wasser bis 5, 25, und 100 mg/kg vergrössert entsprechend die phagozytäre Intensität der Leukozyten im Blut der Fische auf 140% und 40% im Vergleich zum Ausgangszustand.

Die parenterale Einführung des Zinks in der Menge von 0,002, 0,05, 0,5 und 5 mg/kg erhöht entsprechend die phagozytäre Intensität der Leukozyten 1,6 1,4, 2,0 und 4,1 mal.

Die Einführung des Mikroelementes Zink per os in der Menge von 0,005, 5,0 und 10,0 mg/kg ruft keine Änderungen der phagozitären Intensität hervor.

УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ ЛАТВИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА
им. П. СТУЧКИ, т. LXVII. 1965. ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И БИОХИМИЯ, № 6

Ш. БЕРМАН

ВЛИЯНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ВЕГЕТАЦИОННОГО ПЕРИОДА НА РЕЗУЛЬТАТ ЗИМОВКИ СЕГОЛЕТОК КАРПА

Важным условием развития прудового рыбоводства является улучшение качества и повышение количества рыбопосадочного материала, выращиваемого для нагульных прудов госрыбхозов и колхозов.

Серьезным фактором, тормозящим развитие прудового рыбоводства и лимитирующим увеличение рыбопосадочного материала, является значительный отход сеголеток карпа в период зимовки.

Изучение среды обитания первозимующих сеголеток карпа позволило существенно улучшить условия зимовки. Однако решить проблему зимовки одним этим путем оказалось невозможным (Г. В. Никольский, 1963, Г. Кокорев, 1963).

В последние годы наибольшее распространение получило мнение, что зимостойкость сеголеток карпа определяется в первую очередь их физиологическим состоянием, в частности — химическим составом тела (В. А. Сигов; В. С. Кирпичников и Р. Л. Берг, 1952; Г. Д. Поляков, 1956 и др.).

Мы стремились установить изменение физиологического состояния организма сеголеток карпа, выращенных в вегетационный период разной продолжительности, в течение зимнего голодания.

Длительность вегетационного периода может быть изменена как путем более раннего начала зимовки, так и посредством более позднего проведения нереста. В этих двух направлениях и были проведены наши опыты.

МЕТОДИКА

Опыты проводились на сеголетках карпа, полученных от нереста — 25 мая и от нереста — 8 июня. В соответствии с этим сеголетки первой группы условно названы ранними карпами, а второй — поздними карпами.

Ежемесячно, начиная с 43-дневного возраста, мы брали сеголеток раннего карпа и помещали их в аквариум, где они находились в искусственно созданных условиях зимовки при низкой температуре воды. При такой постановке опыта мы считали возможным, сопоставляя результаты зимовки, выяснить, лимитирует ли укороченный вегетационный период исход зимовки, по крайней мере в том случае, когда сокращение вегетационного периода происходит в результате более раннего наступления зимы.

Наряду с ранними карпами экспериментальной зимовке были подвергнуты также и поздние карпы.

Мы непрерывно следили за тем, чтобы условия среды в течение опыта отвечали основным требованиям организма рыбы и исключали возможность возникновения отрицательных факторов, могущих неблагоприятно повлиять на исход зимовки.

Количество кислорода в воде колебалось в пределах 5,5—7,5 *см*³/*л*, содержание углекислоты не превышало 2,8 *см*³/*л*, активная реакция воды характеризовалась pH — 7—7,8. Температура воды в зависимости от возраста подопытной рыбы колебалась от +0,2 до +2,5°С.

Обработка материала по длине (L и l) и весу проводилась общепринятыми методами. Коэффициент упитанности вычислялся по формуле Фультона: $K = \frac{g \cdot 100}{L^3}$ и $K_1 = \frac{g \cdot 100}{l^3}$ где g — вес рыбы в *г*, L — длина тела до конца хвостового плавника, l — длина тела до конца чешуйчатого покрова в см. Детально анализировались данные по K_1.

Из показателей химического состава тела подопытных сеголеток определялись: вода — высушиванием при 100—105°С до постоянного веса; белок — по количеству общего азота, которое умножалось на коэффициент 6,25 (азот определялся методом микро-Кьельдаля); жир — эстрагированием в аппарате Сокслета и вычислением по обезжиренному остатку; зола — озолением в муфельной печи. Результаты были подвергнуты статистической обработке.

Для каждой возрастной группы опыт прекращался тогда, когда у большинства подопытных особей появлялись признаки нарушения координации движений и некоторая часть их погибала.

РЕЗУЛЬТАТЫ ОПЫТОВ

Сеголетки карпа раннего переста были впервые взяты для опыта и помещены в искусственные условия зимовки 6 июля в возрасте 43 дней. Исходные показатели размеров, веса, коэффициента упитанности и химического состава тела, а также данные о динамике этих показателей в течение опытного периода представлены в таблице 1.

5 августа, т. е. через 30 дней после начала зимовки, 10 особей подопытных ранних карпов были взяты на анализ. Однако вскоре, еще через 9 дней, мы вынуждены были прекратить опыт, т. к. 14 августа зимующие сеголетки начали гибнуть.

Как свидетельствуют материалы таблицы 1, за 39 дней зимовки коэффициент упитанности у мальков раннего карпа снизился в среднем на 28,46%, а вес их тела к 14 августа составлял 64,2% исходного веса. Данные статистически достоверны ($P<0,001$).

Падение веса сеголеток обусловлено, в первую очередь, расходованием жиров. Использование белков для энергетических целей в процессе обмена веществ также имело место, но происходило менее интенсивно.

За время экспериментальной зимовки процентное содержание воды в теле сеголеток увеличивалось, хотя абсолютное содержание воды, как видно из приведенного ниже расчета, уменьшилось.

Для определения убыли отдельных компонентов химического состава тела принято во внимание исхудание сеголеток за период обследования. При посадке на зимовку количество воды в теле малька весом 2,29 *г* составляло 1,87 *г* (81,71%), а к моменту окончания опыта, через 39 дней, количество воды в теле при весе сеголетки 1,47 *г* уменьшилось до 1,27 *г* (86,58%).

То же самое и в отношении золы. Так, если исходное содержание золы в теле сеголетки весом 2,29 *г* составляло 1,94%, т. е. 0,044 *г*, то к концу опыта, несмотря на некоторое увеличение процентного содержания золы до 2,38%, ее абсолютное количество снизилось до 0,035 *г*.

Таким образом, количество зольных элементов по сравнению с количеством жира и белка в период голодания уменьшается незначительно, поэтому содержание золы в теле сеголеток оказывается относительно возросшим.

12 июля была взята следующая группа рыб (в возрасте 49 дней) для опыта (табл. 1). Статистически достоверных отличий между биологическими и химическими показателями рыб первой и второй групп (соответсотвенно от 6 и 12 июля)

Таблица I

Изменение химического состава тела 43—49 дневных мальков карпа раннего нереста в условиях зимовки при t°+2,5°C*

Дата		Возраст в днях	Зимовка в днях	Длина в см	Вес в г	K_1	Ввода в %	Жир в % на		Белок в % на		Зола в % на	
								сухой вес	сырой вес	сухой вес	сырой вес	сухой вес	сырой вес
Начало опыта	6 VII	43	—	4,45	2,29	2,60	81,71	19,21	3,51	69,95	12,68	10,58	1,94
Конец опыта	14 VIII	82	39	4,29	1,47	1,86	86,58	4,02	0,54	78,24	10,50	17,73	2,37
Начало опыта	12 VII	49	—	4,6	2,38	2,41	81,09	21,02	4,01	69,15	13,03	9,86	1,88
Конец опыта	8 IX	107	58	4,56	1,76	1,86	86,68	4,57	0,61	79,80	10,63	15,62	2,08

* В таблицах представленные данные являются средними арифметическими для 20 особей.

нам установить не удалось. Однако изменения химического состава тела ранних карпов (от 12 VII) в течение опыта статистически достоверны ($P<0,001$).

За первые 27 дней зимовки относительное содержание жира, рассчитанное на сырой вес в теле мальков в среднем уменьшилось на 58,85%, а содержание белка — на 7,83%. В последующий период, продолжительностью в 31 день, содержание жира снизилось на 63,03%, а содержание белка — на 11,4% по сравнению с исходными данными.

В начальный период зимовки жир расходовался более интенсивно, чем во второй половине зимовки. Расходование белка наблюдалось на протяжении всего опыта.

К концу периода голодания процентное содержание золы повысилось на 10,6%, а процентное содержание воды — на 6,9% от исходного.

На примере ранее описанного опыта мы имели основание считать, что и в условиях данного опыта абсолютное количество золы и воды в теле сеголеток уменьшилось. Приводим таблицу 2, в которой представлены данные по снижению содержания химических компонентов тела рыбы в граммах на 1 *кг* исходного веса мальков, подтверждающие наше предположение.

Таблица 2

Изменение содержания воды, жира, белка и золы у карпов раннего нереста в процессе голодания в % и в г на 1 кг исходного веса
(возраст мальков в начале голодания — 49 дней, продолжительность опыта — 58 дней)

	Начало голодания		Конец голодания				
					расход		разница %
	%	г	%	г	г	в %	
Вес	100	1000	100	739,5	—260,5	26,0	—
Вода	81,09	810,9	86,68	641,0	—169,8	21,0	+5,59
Жир	4,01	40,1	0,61	4,5	— 35,6	89,0	—3,40
Белок	13,03	130,3	10,63	78,6	— 51,7	39,6	—2,40
Зола	1,88	18,8	2,08	15,4	— 3,4	18,0	+0,20

Оказалось, что в результате 58-дневного голодания вес подопытных особей уменьшился на 26,05%, а коэффициент упитанности — на 22,8% от исходного.

Из табл. 3 видно, что в процессе голодания и у следующей подопытной группы сеголеток, выловленной в возрасте 80 дней, наиболее значительно истощались в организме запасы жира. Количество белка воды и золы уменьшалось в меньшей степени. Сеголетки карпа, выловленные 12 августа в

возрасте 80 дней (при ср. весе 19,08 *г*) отличались большей зимостойкостью, чем ранее выловленные карпы. Они находились в искусственно созданных условиях зимовки 164 дня. Температура воды в течение опыта поддерживалась на уровне +1°С.

Как следует из табл. 3, за время опыта в теле мальков изменилось соотношение воды и сухого вещества. При каждом последующем анализе процентное содержание воды уменьшалось, причем с различной интенсивностью в разные периоды опыта. Потеря в весе, исхудание было особенно интенсивным в течение первых 100 дней голодания, а затем, к концу опыта, шло менее интенсивно. В первом периоде голодания также и жир тратился интенсивно, а к концу опыта (через 100 дней), когда содержание жира уменьшилось до 1,0% на сырой вес, он расходовался чрезвычайно экономно. К концу опыта в теле рыбы установлено всего 0,59% жира на сырой вес.

Темпы расходования белка по сравнению с темпами расходования жира имели иной характер. В начале (первые 51 дня опыта) трата белка была незначительной, а впоследствии, по мере истощения запасов жира, темпы расходования белка повысились.

Содержание золы и воды к концу зимовки также несколько уменьшилось. За период голодания продолжительностью в 164 дня вес сеголеток карпа снизился на 26,5% от исходного; количество жира, входящего в состав 1 *кг* веса тела 80-дневных сеголеток раннего карпа, уменьшилось в 10 раз, количество белка — почти в 1,8 раза от исходного содержания. Количество золы и воды уменьшилось в значительно меньшей степени, чем содержание жира и белка. Данные по изменению веса, содержания жира и белка в теле рыб в течение опыта статистически достоверны ($P<0,01$).

Следующую подопытную группу составляли сеголетки карпа раннего нереста с вегетационным периодом в 110 дней — более продолжительным, чем у всех ранее рассмотренных групп. Они были выловлены 11 сентября и находились в условиях экспериментальной зимовки 270 дней.

В таблице 4 приведены результаты биологических показателей и химического состава тела сеголеток в виде средних, полученных в результате анализа 10 экземпляров. С 10 июня анализу подвергнуто 19 особей.

Длительное, 270-дневное голодание при низкой t° воды не привело сеголеток карпа к полному истощению.

Г. Д. Поляков (1956) приводит следующие критические показатели химического состава тела сеголеток карпа, погибающих от истощения вследствие длительного голодания: ср.

Таблица 3

Изменение химического состава тела 80-дневных сеголеток карпа раннего нереста в условиях зимовки при +1°С

Дата		Возраст в днях	Зимовка в днях	Длина в см	Вес в г	K_1	Вода в %	Жир в % на сухой вес	Жир в % на сырой вес	Белок в % на сухой вес	Белок в % на сырой вес	Зола в % на сухой вес	Зола в % на сырой вес
Начало опыта	12 VIII	80	—	9,2	19,08	2,42	78,12	19,28	4,38	67,57	14,62	13,14	2,87
	2 X	131	51	9,10	17,56	2,32	81,16	10,14	1,91	74,04	13,95	15,28	2,87
	20 X	180	100	9,00	15,53	2,13	83,27	5,97	0,99	75,43	12,62	18,58	3,10
Конец опыта	23 I	244	164	8,90	14,03	1,99	85,91	4,19	0,59	76,86	10,83	19,01	2,68

Таблица 4

Изменение химического состава тела 110-дневных сеголеток карпа раннего нереста в условиях зимовки при $t°$ от +0,2 до +0,5°С

Дата		Возраст в днях	Зимовка в днях	Длина в см	Вес в г	K_1	Вода в %	Жир в % на сухой вес	Жир в % на сырой вес	Белок в % на сухой вес	Белок в % на сырой вес	Зола в % на сухой вес	Зола в % на сырой вес
Начало опыта	11 IX	110	—	10,87	36,2	2,74	74,59	29,50	7,50	57,20	14,53	12,33	3,13
	23 XI	183	73	10,90	33,41	2,58	80,16	13,49	2,67	69,57	13,99	15,97	3,17
	28 I	249	139	10,80	30,50	2,42	82,78	7,32	1,26	74,33	12,80	17,88	3,08
Конец опыта	6—10 VI	380	270	10,80	26,71	2,12	84,83	6,52	0,99	72,58	72,58	11,01	3,16

содержание воды в теле рыбы — 88,65%, жира — 0,35%, белка — 6,8%, золы — 4,2%.

В нашу задачу не входило доведение рыбы до гибели от физиологического истощения. Мы пытались лишь выяснить, в какой мере продолжительность вегетационного периода влияет на зимостойкость сеголеток карпа.

Исходное состояние организма сеголеток карпа, поступивших на зимовку в возрасте 110 дней, значительно отличалось от состояния организма всех рыб, ранее использованных нами в опытах. Сеголетки последней группы превзошли 80-дневных: по весу — на 89,7%, по коэффициенту упитанности — на 13,2%, по содержанию жира — на 66,9%.

За 270 дней, проведенных в условиях экспериментальной зимовки, сеголетки карпа потеряли в весе 26,22% от исходного. В первой половине зимовки вес снижался с большой интенсивностью. Коэффициент упитанности снизился в указанный период на 22,6%, содержание жира уменьшилось в 7,4 раза. В то же время процентное содержание воды и золы относительно увеличилось.

В течение первых 73 дней голодания организм подопытной рыбы потерял больше $^2/_3$ жира. В последние 4 м-ца голодания жир расходовался очень экономно. В этом же периоде наблюдалось повышение темпов расходования белка. Имело место также абсолютное уменьшение содержания золы и воды (табл. 5).

Заслуживает внимания то обстоятельство, что уменьшение белка на 1 *кг* исходного веса сеголеток, взятых в опыт в возрасте 110 дней, составило 44,1%, а у сеголеток, взятых в опыт в возрасте 49 дней — 39,6%, хотя первые провели

Таблица 5

Изменение содержания воды, жира, белка и золы у ранних карпов в период голодания в % и г на 1 кг исходного веса

(возраст сеголеток в начале опыта — 110 дней, продолжительность опыта — 270 дней)

	Начало голодания		Конец голодания				
					расход		
	%	г	%	г	г	в % к исходн.	разница %
Вес	100,0	1000,0	100,0	737,8	—262,2	26,2	—
Вода	74,59	745,9	84,83	625,8	—120,1	16,1	+10,24
Жир	7,50	75,0	0,99	7,3	— 67,7	90,2	— 6,51
Белок	14,53	145,3	11,01	81,2	— 64,1	44,1	— 3,52
Зола	3,13	31,3	3,16	23,3	— 8,0	25,5	+ 0,03

зимовку почти в 5 раз более продолжительную, чем вторые. Решающее значение на результаты зимовки оказало, по-видимому, содержание жира в теле рыбы.

Исходное содержание жира у 110-дневных сеголеток (7,5%) значительно превышало количество жира в теле 43-дневных сеголеток (4,0%), выращенных в более короткий вегетационный период. Поэтому сеголетки, выращенные в более продолжительный срок, оказались физиологически подготовленными к зимовке.

Установленные факты подтверждают мнение многих авторов, что между жирностью и зимостойкостью карпов существует определенная зависимость.

Кроме того, в предыдущих опытах нами установлена определенная зависимость между возрастом рыбы и ее зимостойкостью (Ш. Берман, 1956). Чем продолжительнее был вегетационный период, тем более зимостойкими оказались сеголетки, по крайней мере в том случае опыта, когда длина вегетационного периода ограничивалась более ранним началом зимовки.

Отсюда можно заключить, что сеголетки, выращенные в относительно короткий срок — 110 дней, оказались вполне зимостойкими, конечно, при необходимом условии — хорошем качестве сеголеток, которое определяется в первую очередь содержанием жира и белка.

Само собой разумеется, что если бы под опытом находились сеголетки, выращенные в еще более продолжительный срок, т. е. в период, соответствующий длине вегетационного периода в климатических условиях нашей республики, то возможная продолжительность зимовки удлинилась бы еще больше.

Подобный опыт нами поставлен не был. Сеголетки, выловленные осенью, были помещены в зимовальники, и за ними был установлен систематический контроль.

В дальнейших экспериментальных исследованиях мы стремились выяснить, как влияет второй путь сокращения вегетационного периода, т. е. проведение позднего нереста, на зимостойкость сеголеток.

В связи с этим были поставлены опыты на сеголетках позднего карпа.

Продолжительность вегетационного периода у поздних карпов была к началу опыта 46 дней. Они перенесли условия искусственной зимовки длительностью 105 дней, т. е. зимовали лучше, чем ранние карпы той же возрастной группы (вегет. период 43 и 49 дней, продолжительность зимовки соответственно — 39 и 58 дней).

Опыт проводился при температуре воды в аквариуме +1,5°С и был закончен 10 ноября.

Анализ данных, представленных в табл. 6, показывает, что в течение опыта вес сеголеток поздних карпов уменьшился на 37,84%, а коэффициент упитанности — на 22,1% от исходного. Значительно уменьшилось процентное содержание жира и белка, менее значительно — процентное содержание золы. Результаты статистически достоверны ($P<0,01$).

Таблица 6

Изменение химического состава тела 46-дневных сеголеток позднего карпа в условиях экспериментальной зимовки при t°+1,5°С

Дата	Возраст в днях	Зимовка в днях	Длина в *см*	Вес в *г*	K_1	Вода в %	Жир в % на		Белок в % на		Зола в % на	
							сухой вес	сырой вес	сухой вес	сырой вес	сухой вес	сырой вес
Начало опыта 28 VII	46	—	5,65	5,10	2,58	81,01	19,65	3,77	69,07	13,08	11,05	2,11
24 IX	104	58	5,58	3,65	2,10	86,04	7,23	1,01	72,48	10,12	20,27	2,82
Конец опыта 10 X	151	105	5,41	3,17	2,01	88,67	4,32	0,50	71,40	8,09	24,27	2,75

Также и интенсивность энергетических затрат, рассчитанная по количеству израсходованного жира и белка, была различной у сравниваемых групп сеголеток в условиях опыта.

Таблица 7

Энергетические затраты подопытных сеголеток карпа в период экспериментальной зимовки
(в *к/кал* на 1 *кг* веса тела в сутки*)

Объекты исследования	Возраст в днях (начало опыта)	Продолжительность зимовки в днях	Вес в *г*	Энергетические затраты к *кал/кг* в сутки
Ранние карпы	43	39	2,29	14,1
Ранние карпы	49	58	2,38	9,7
Поздние карпы	46	105	5,10	6,4
Ранние карпы	80	146	19,08	4,0
Ранние карпы	110	270	36,2	3,3

* Калорийность 1 *г* жира соответствует 9,5 *к/кал*, — 1 *г* белка (физиологическая) — 4,3 *к/кал* (Леви, цитировано по М. Ф. Томме, 1949).

Из представленных в таблице 7 данных следует, что с возрастом и повышением веса уменьшаются энергетические затраты подопытных сеголеток и увеличивается их зимостойкость.

Причиной более длительной зимовки 46-дневных поздних карпов по сравнению с 43—49-дневными ранними карпами нужно считать, прежде всего, несколько лучшее исходное состояние первых по содержанию жира и белка. Сеголетки позднего карпа были крупнее сеголеток 43- и 49-дневного раннего карпа. Энергетические затраты и процесс исхудания в условиях зимовки протекали у них менее интенсивно, чем у сеголеток раннего карпа.

В результате более продолжительного голодания к концу опыта показатели жира и белка у поздних карпов снизились значительнее, чем у ранних карпов того же возраста.

Положительное влияние на зимостойкость поздних карпов оказали также благоприятные условия среды. Лучшему эмбриональному и раннему постэмбриональному развитию поздних карпов способствовали оптимальные температурные условия и хорошая кормовая база. Поэтому 49-дневные ранние карпы, несмотря даже на некоторое превосходство над 46-дневными поздними карпами в содержании основного энергетического вещества — жира, уступали последним в зимостойкости.

Таким образом карпы от позднего нереста даже при близком химическом составе тела, по сравнению с карпами раннего нереста одинаковых возрастных групп, характеризуются лучшими биохимическими показателями организма и большей зимостойкостью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берман Ш. А. К вопросу о физиологической подготовленности сеголеток карпа к зимовке. Известия АН Латвийской ССР, № 5/106, 75—82, 1956.

2. Кирпичников В. С. К проблеме повышения зимоустойчивости сеголеток карпа, сазана и их гибридов. Сообщение I. О зависимости между упитанностью рыб, температурой воды и кормовыми запасами прудов. Зоологический журнал, т. XXXI, в. 4, 595—606, 1952.

3. Кокарев Г. Температура и обмен воды при зимовке карпов. Рыбоводство и рыболовство, № 6, 21—2, 1963.

4. Никольский Г. В. Экология рыб. Москва, 1963.

5. Поляков Г. Д. Эффективность использования кормов карпом и сельскохозяйственными животными. Рыбное хозяйство № 3, 56—60, 1956.

6. Сигов В. А. Биометрические критерии жизнеспособности первозимующих карпов. Труды Всероссийского научного исследовательского института прудового рыбного хозяйства (ВНИПРХ), т. IV, 9—25. Воронеж, 1947.

7. Томме М. Ф. Обмен веществ и энергии у сельскохозяйственных животных. Сельхозгиз, Москва, 1949.

S. BEHRMANN

ÜBER DEN EINFLUSS DER DAUER DER VEGETATIONS-PERIODE AUF DIE ÜBERWINTERUNG VON EINSÖMMERIGEN KARPFEN

ZUSAMMENFASSUNG

Die Entwicklung der Karpfenwirtschaft in den Binnenfischereien der LSSR wird durch das Eingehen der Einsömmerigen während der Überwinterungsperiode stark beeinträchtingt.

Unsere Aufgabe war es, die Veränderungen im physiologischen Zustand der Einsömmeringen während der Überwinterungsperiode in Abhängigkeit von der Dauer der vorangehenden Vegetationsperiode festzustellen.

Die Dauer der Vegetationsperiode wurde einerseits durch frühen Beginn der Überwinterungsperiode, andererseits durch verspätete Laichzeit künstlich beeinflusst.

Die Versuchstiere wurden in Aquarien unter künstlichen Überwinterungsbedingungen, ohne Nahrung, bei einer Wassertemperatur von 0,2°C bis 2,5°C (in Abhängigkeit vom Alter), untergebracht.

Es wurden die biologischen Indices der Einsömmerigen, der Koeffizient ihres Ernärungszustandes und die chemische Zusammensetzung des Organismus untersucht.

Es gelang festzustellen, dass Einsömmerige mit längerer Vegetationsperiode zu Beginn des Versuches der künstlichen Überwinterung sich in einer besseren Körperkondition befanden. Sie enthielten mehr Fette und Eiweiss und hatten ein grösseres Gewicht, was aller Wahrscheinlichkeit nach die Ursache ihrer erhöhten Überwinterungsfähigkeit war.

Während der künstlichen Überwinterungsperiode verloren an Gewicht in erster Linie die einsömmerigen Karpfen mit einer Vegetationsperiode von 43 Tagen. Sie büssten 35,81% ihres Körpergewichtes ein, ihr Ernährungskoeffizient fiel um 28,46%. 110 Tage alte Einsömmerige, die sich im Zustande der Überwinterung sieben mal länger befanden, verloren an Gewicht bloss 26,22%, ihr Ernährungskoeffizient sank um 22,6%. Die Ursache hierfür ist in dem geringeren Energieverlust bei den letzteren zu suchen.

Der Energieverlust wurde vor allem durch Verbrauch der Fettreserven gedeckt. Dieser verlief besonders intensiv zu Beginn der Überwinterungsperiode. Zu dieser Zeit war der Verbrauch von Eiweiss gering, vergrösserte sich aber parallel dem Schwunde der Fettreserven. Die Inanspruchnahme der Fettreserven war besonders gross bei den 110 tägigen Einsöm-

merlingen, die die längste Vegetationsperiode durchgemacht hatten. Der Verlust an Eiweiss, hingegen, war bei ihnen geringer.

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die «spähten» Karpfen (Laichzeit 8. VI) sich bedeutend kältebeständiger erwiesen, als die «frühen» Karpfen (Laichzeit 20. V) gleichen Alters. Dieser Umstand ist wahrsheinlich durch den besseren Anfangszustand hinsichtlich des Fett- und Eiweissgehaltes und durch das fast doppelt so grossen Gewicht zu erklären, demzufolge die energetischen Prozesse bei ihnen weniger intensiv verliefen

УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ ЛАТВИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА
им. П. СТУЧКИ, т. LXVII. 1965. ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И БИОХИМИЯ, № 7

Доцент Э. ЦИЕЛЕНС и асс. Г. ЧЕМА

КОНЦЕНТРАЦИЯ КОФЕРМЕНТОВ НИКОТИНАМИДНУКЛЕОТИДА (НАД+НАДФ) В СТЕНКАХ КИШЕЧНИКА ЦЫПЛЯТ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОСТАВА КОРМА

Стенки кишечного тракта выполняют очень сложные функции. Они не только участвуют во всасывании питательных веществ, но и выполняют важную экскреторную и синтетическую функцию. От всасывательной способности стенок кишечника зависит использование такого важного вещества, как витамин B_{12}. Имеются наблюдения, что антибиотики увеличивают всасывание витамина B_{12} в стенках кишечника [1].

Исследования Бабушкиной [2] установили, что слизистая оболочка кишечника выделяет в составе своего секрета значительные количества фосфолипидов. В этом отношении железистый аппарат кишечника резко отличается от других пищеварительных желез. Фосфолипиды синтезируются в кишечном эпителии [3].

Наряду с печенью слизистая оболочка кишечника синтезирует фосфолипиды для всего организма, она отделяет их в просвет пищеварительного тракта, откуда продукты расщепления фосфолипидов поступают в общий обменный фонд организма. Значит, эпителий стенок кишечника в функциональном отношении имеет некоторое сходство с печенью. Это дает основание сравнить эти два органа по их биохимическому составу.

Наши данные свидетельствуют, что количество холина в стенках передних отделов кишечника цыплят и в печени приблизительно одинаково [4].

В этой работе внимание обращалось на кофермент никотинамиднуклеотида (НАД+НАДФ), о количественном колебании которого в печени, в зависимости от состава корма, уже многое установлено. Сейрет и Перлцвейг [5] показали, что, если у крыс в корме мало белка, их печень неспособна связывать никотиновую кислоту. Уровень никотинамиднуклеотида в печени цыплят зависит от количества триптофана в пище [6, 7].

При недостаточном содержании белка в пище (9% казеина) уменьшается содержание НАД в печени. При включении в диету *d, l*-метионина и *l*-цистина увеличивается содержание никотинамиднуклеотида в печени [8].

В этой работе определялась концентрация кофермента никотинамиднуклеотида в стенках кишечника как зародышей цыплят, так и цыплят в возрасте 50—75 дней, получавших в корм растительный белок с добавками холина и антибиотического препарата биовита.

МЕТОДИКА ОПЫТА

Опыт проводился в Институте биологии АН ЛССР с цыплятами породы белый леггорн, откуда и были получены образцы.

Обезглавив животное, препарируется его кишечник. Образцы длиной в 10 см были вырезаны из 5 разных мест: I — из 12-перстной кишки, II — из средней части тонкой кишки, III — вблизи слепой кишки, IV — из слепой кишки, V — из прямой кишки.

Кишечник зародышей цыплят анализировался целиком. 0,2—0,5 *г* кишечника растирают в ступке со стеклом, добавляя 1,5 *мл* 2% амида никотиновой кислоты, 2 *мл* 0,1 н HCl, 0,15 *мл* 1,5% Ce $(NO_3)_2$ и 3 *мл* 5% CCl_3COOH. Растирание продолжают 5 минут до получения однородной массы, которую переносят в центрифужную пробирку. После центрифугирования 3 раза споласкивают с 2 *мл* 5% CCl_3COOH и повторно центрифугируют. Объединенные прозрачные центрифугаты фильтруют через фильтровальную бумагу и доливают 2,5% CCl_3COOH до 25 *мл* в мерную колбу. Затем анализ продолжают так, как он описан у Робинсон и др. [9]. Эти авторы проводят конденсацию ацетоном, но Швейгерт [10] показал, что при конденсации ацетоном индол, скатол и другие вещества также дают сходную флюоресценцию и таким образом увеличивают результаты содержания кофермента никотинамиднуклеотида. Эту побочную флюоресценцию можно устранить, если вместо ацетона употреблять метилэтилкетон. Поскольку есть исследователи, которые не учитывают это наблюдение Швейгерта, Фильчагин [8], Старинов [11], мы проводили конденсацию и ацетоном, и метилэтилкетоном, чтобы сравнить результаты.

Конденсацию метилэтилкетоном мы проводили, нагревая 5 минут вместо 2 минут при конденсации ацетоном.

Таблица 1

Содержание кофермента никотинамиднуклеотида в стенках кишечника зародыша

(в гаммах на 1 *г*)

Группа	Диета кур	Возраст зародышей в днях	Конденсировано метилэтилкетоном	Конденсировано ацетоном
I	Растительные белки	16	37	75
		18	—	62
		21	65	72
II	Животные белки	16	92	132
		18	67	127
		21	62	75
III	Животные белки + биовит	16	45	75
		18	82	137
		21	55	112

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из таблиц № 1 и № 2, количества НАД определенные, проводя конденсацию ацетоном и метилэтилкетоном, значительно отличаются друг от друга. При конденсации ацетоном во всех случаях получены повышенные результаты. Очевидно, это результат побочной флюоресценции, которую дают индол и др. Характерно, что повышенные результаты при конденсации ацетоном наблюдались также в стенках кишечника зародышей цыплят. Поэтому, определяя НАД в тканях животных по флюорометрическому методу [9], следует проводить конденсацию метилэтилкетоном, а не ацетоном, как советуют Карпентер и Кодичек [12].

Мы считаем, что действительны количественные данные НАД в таблице «конденсировано метилэтилкетоном».

Сравнивая количества НАД в стенках кишечника цыплят, видно, что они колеблются в зависимости от наличия витамина PP, триптофана и белка в корме. У цыплят, получавших 76% кукурузы в корм (4 группа), наиболее низкий уровень НАД в стенках кишечника. Добавка в корм хлорида холина не давала заметных изменений (5 гр.), а добавка в корм биовита повышала уровень НАД в стенках кишечника (7 гр.). Заменяя большую часть кукурузы соевой, ячменной,

Таблица 2

Содержание кофермента никотинамиднуклеотида в стенках кишечника цыплят (в гаммах на 1 *г*)

Группа	Диета цыплят	Возраст цыплят в днях	Конденсировано метилэтилкетоном части кишечника					Конденсировано ацетоном части кишечника				
			I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
4.	Раст. белки (основной рацион)	40	—	63	—	94	172	312	—	150	156	250
			202	109	152	78	70	397	218	187	181	171
			125	109	70	109	125	202	187	156	187	218
		среднее	165	93	111	127	122	303	202	164	176	213
5.	Раст. белки (основной р. + холин 0,15%)	40	156	94	78	109	63	—	140	187	202	202
			118	172	109	156	133	171	312	156	140	171
			109	85	78	89	156	156	218	109	140	175
			125	78	78	94	70					
		среднее	127	107	86	112	105	163	223	150	160	182
6.	Раст. белки (основной рацион)	75	187	175	112	137	106					
			106	206	200	200	150	412	375	268	250	212
			250	243	218	125	100	—	312	287	237	312
			250	187	137	200	106	400	462	400	312	192
		среднее	198	202	167	165	115	406	384	318	266	238
7.	Основной рацион + биовит	75	—	207	340	167	80	317	542	550	390	157
			325	332	152	187	80	600	632	275	316	155
			250	182	237	187	—	532	382	532	282	207
			196	229	332	183	225	367	407	342	292	332
		среднее	257	237	265	181	128	454	490	425	322	212
8.	Раст. белок (измененный рацион)	65	344	327	298	280	265	780	610	531	485	422
			360	360	280	218	202	1047	1015	437	610	390
		среднее	352	343	289	249	233	913	812	482	547	406
9.	Измененный рацион + биовит	65	531	562	500	437	406	843	1187	937	593	500
			500	610	500	406	500	1000	1327	875	547	577
		среднее	515	586	500	421	453	921	1257	907	570	538

пшеничной и овсяной мукой, уровень НАД в стенках кишечника значительно выше (8 гр.), особенно если еще добавлять биовит (9 гр.). Это объясняется тем, что в этом корме большее содержание витамина PP и высшее содержание триптофана в белке.

Видно, что даже в последней стадии зародышевого развития количество НАД значительно меньше, чем у 50-дневных цыплят.

В эмбриональном периоде также проявляется влияние состава корма кур на уровень НАД в стенках кишечника. У зародышей, развивавшихся в яйцах от кур, получавших животные белки, уровень НАД был выше, чем в зародышах из яиц от кур, получавших только растительный белок.

Очевидно, что стенки кишечника, несмотря на то, что через них проходят все составные части корма, не синтезируют постоянное количество НАД, а они ощущают недостаток отдельных компонентов корма, подобно другим органам (печени).

Сравнивая количества НАД в стенках кишечника цыплят и печени по данным Фишера [7], видно, что они в общем сходны.

ВЫВОДЫ

Определяя НАД+НАДФ коферментов по флюорометрическому методу Перлцвейга и Хафа, следует проводить конденсацию метилэтилкетоном, а не ацетоном. При конденсации ацетоном во всех случаях получены повышенные результаты. Характерно, что повышенные результаты при конденсации ацетоном наблюдались также в стенках кишечника зародышей цыплят.

Сравнивая количества пиридин коферментов в стенках кишечника цыплят, видно, что они колеблются в зависимости от наличия витамина PP, триптофана и белка в корме. Заменяя большую часть кукурузы ячменем, пшеницей, овсом и соей, уровень НАД+НАДФ в стенках кишечника значительно выше. В стенках кишечника зародыша уровень пиридин коферментов значительно ниже. В эмбриональном периоде также проявляется влияние корма кур на уровень НАД+НАДФ в стенках кишечника.

ЛИТЕРАТУРА

1. Г. Джакс. Антибиотики в кормлении животных. Сельхозгиз, 1959.
2. Бабушкина Л. М. Вопр. мед. химии, 1958, т. 4, 254.
3. Шлыгин Г. К. Вопр. питания, 1961, 5, 3.
4. Циеленс Э. А. Физиология и биохимия с/х жив. III, Рига, 1962, 213.
5. Sarett U. P., Perlzweig W. A., Nutrition 1943, 25, 173.
6. Williams O. N., Feigelson P., Elvehjem C. A., J. Biol, Chem., 1950, 187, 597.
7. Fisher H. Scolt H. M., Johnson B. C., Archives of Biochem. a. Bioph. 1955, 56, 130.
8. Фильчагин Н. М. Вопр. питания, 1961, 5, 26.
9. Robinson J., Lewitas N., Rosen F., Perlzweig W. A., J. Biol. Chem. 1947, 170, 653.
10. Schweigert B. S., Science, 1947, 106, 522.
11. Старинов П. Д. Лабораторное дело. 1962, 6, 37.
12. Carpenter K. J., Kodicek E., Biochem. J. 1950, 46, 421.

УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ ЛАТВИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА им. П. СТУЧКИ, т. LXVII. 1965. ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И БИОХИМИЯ, № 8

Э. ЦИЕЛЕНС
Доц. канд. хим. наук

ОБМЕН ХОЛИНА В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ ЖИВОТНЫХ

Изучая отдельные стороны обмена веществ под углом зрения сравнительной биохимии, открывается возможность раскрытия закономерностей эволюции обмена веществ. В этом аспекте значительный интерес представляет изучение биохимии эмбрионального развития, так как такие исследования могут дать исключительно ценные данные для эволюционной биохимии.

Мы с этой точки зрения изучаем обмен холина. Нами установлено, что в холине нуждаются как животные, так и растительные организмы уже на ранней эмбриональной стадии онтогенеза [1, 2, 3].

В этой работе мы представляем данные о динамике холина в эмбриогенезе рыб, амфибий, насекомых, птиц и млекопитающих.

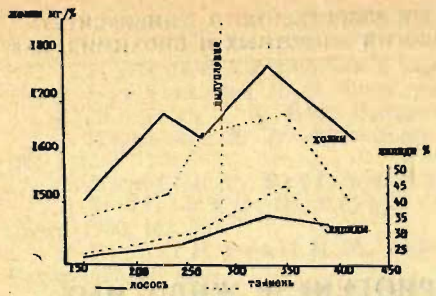
МЕТОДИКА

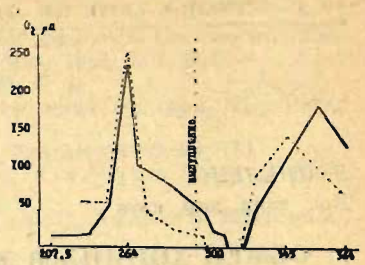
Холин экстрагировался абсолютным метанолом и осаждался рейнекатом (1). Холиноксидазу определяли манометрически в аппарате Варбурга. Для анализа брали средний образец из 2—5 яиц, 30—50 яичек насекомых или из 100 икринок в каждой стадии развития.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Динамика холина и активности холиноксидазы в икре рыб.

Содержание холина в икринках лосося (*Salmo salar* L.) и тайменя (*Salmo trutta* L.) составило (6 табл.) около 1500 *мг*% холина на сухой вес, т. е. примерно столько же, сколько яйца птиц. По мере приближения момента вылупления и даже после этого количество холина увеличивается как из расчета на сухой вес, так и на одну икринку (рис. 1 и 2).





—— лосось - - - - - таймень

Рис. 1. Динамика холина и липидов в икре лосося и тайменя во время инкубации.

Рис. 2. Динамика активности холиноксидазы в икре лосося и тайменя во время инкубации.

Таким образом, содержание (относительное) холина в личинке рыбы больше, чем в исходной икринке. Динамика жира в процессе инкубации икринки имеет сходство с динамикой холина (рис. 1). Количество жира возрастает соразмерно количеству холина и в дальнейшем соразмерно снижается. Это свидетельствует о тесной связи между обменом холина и жира в процессе эмбрионального развития рыб.

Некоторые представления о характере метаболизма холина в процессе инкубации дает изучение динамики холиноксидазной активности. Как показывает кривая (рис. 2), во второй половине инкубационного периода отмечаются значительные изменения активности холиноксидазы. Кривая характеризуется двумя пиками: первый пик наблюдается незадолго перед вылуплением, а второй через некоторое время после вылупления. Сразу же после вылупления холиноксидаза вовсе не проявляет активности.

Поскольку холиноксидаза является ферментом, окисляющим холин в бетаин, то, по-видимому, в процессе эмбрионального развития зародыша холин расходуется, но синтез его превосходит расход, и поэтому мы наблюдаем некоторое повышение количества холина. Кривая активности холиноксидазы в эмбриогенезе свидетельствует о стадийном характере обмена холина.

ДИНАМИКА ХОЛИНА В ИКРЕ ЛЯГУШКИ *(RANA TEMPORARIA L.)*

Мы определяли содержание холина в неоплодотворенной (выделенной из организма лягушки) и оплодотворенной икре до 28-й стадии развития, что морфологически характеризуется появлением передних лапок. Результаты показаны в 1-й табл.

Таблица 1

Динамика холина в овогенезе и эмбриогенезе лягушки *(Rana temporaria L.)*

	Стадия развития	Холин в *мг* %
1	Икра в яичнике	1064
2	Икра в яйцеводе	858
3	Икра во влагалище	618
4	Икра после оплодотворения	405
5	7-я стадия	330
	Вылупление	
6	21-я стадия	276
7	24-я стадия	168
	Активное питание	
8	26-я стадия	221
9	29-я стадия	680

Выделенная из организма лягушки икра находилась в трех различных стадиях готовности: 1-я из яичников характеризовалась наиболее высоким содержанием холина — 1064 *мг*%, 2-я из яйцевода — содержание холина 858 *мг*/%, 3-я из влагалища, содержание холина 618 *мг*%. После оплодотворения содержание холина составляло 405 *мг*%. В процессе инкубации содержание холина постепенно снижалось. На 24-й стадии развития, характеризующейся морфологически закрытием жаберной крышки на правой стороне, содержание холина составляет 168 *мг*%. Это наименьшая концентрация холина за весь период эмбрионального развития. За весь период инкубации расходуется 78% холина. Начиная с 26-й стадии развития, характеризующейся активным питанием, содержание холина в организме быстро нарастает. До 21-й стадии, т. е. скоро после вылупления, потеря холина составляет лишь 32%.

ДИНАМИКА ХОЛИНА В РАЗВИТИИ НАСЕКОМЫХ

Мы проследили также за динамикой холина в эмбриогенезе двух представителей класса насекомых: у шелкопряда (*Bombyx mori* L.) и шершеня (*Vespa crabro*). При этом у шелкопряда нами прослежено за динамикой холина на протяжении всего жизненного цикла: в стадии яичка, личинки, куколки и бабочки. В яичках шелкопряда содержание холина составляло 87 *мг*%. В процессе инкубации количество холина постепенно снижается. Таким образом, за инкубационный пе-

риод теряется 68% холина. В личиночной стадии количество холина резко увеличивается — примерно в 18,7 раза. В этот период личинка пожирает листья тутового дерева. В листьях содержится в среднем 114 *мг*% холина (на сухой вес). Личинка получает по крайней мере всего 4,3 *мг* холина. Поскольку в теле личинки содержится примерно 1,9 *мг* холина, то половина поступающего холина по крайней мере расходуется.

Интересно сравнить динамику холина с динамикой жира на отдельных этапах жизненного цикла шелкопряда, как это показано на рис. 3. Как видно, между динамикой холина и жира существует самый тесный параллелизм.

Содержание холина в яйцах насекомых может быть очень различным, и оно понижается во время инкубации.

Таблица 2

Содержание холина у шелкопряда на всех этапах развития

Стадия	Холин *мг*%	На каждую единицу *мг*
Яичко	87	0,00005
Личинка	26,7	0,00004
Куколка	506	1,88
Бабочка (после кладки яиц)	478,4	0,53

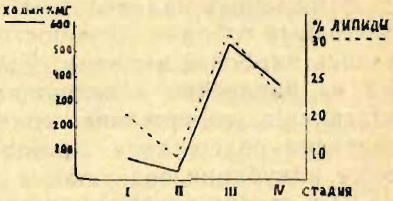


Рис. 3. Динамика холина и липидов на отдельных этапах жизненного цикла шелкопряда.

По сравнению с другими насекомыми особенно большое количество холина содержится в яйцах и личинках пчел. Кроме того, личинки окружены кормом, состоящим из молочка и перги, которые также богаты холином.

Содержание холина в молочке 504 *мг*% на сухой вес.

Содержание холина в перге 403 *мг*% на сухой вес.

Содержание холина в личинках рабочих пчел в процессе инкубации продолжает повышаться (4-я таблица).

Ячейка, в которой находится личинка рабочей пчелы, запечатывается на 9 дней инкубации. Отсюда следует, что с этого дня холин с пищей больше не поступает. Как видно из 4-й таблицы, в первые дни после запечатывания ячейки

уровень холина в личинке падает, а к концу инкубации повышается вдвое. На 21-й день инкубации в только что вылупившейся рабочей пчеле, содержание холина опять понижается до 440 *мг*%. Очевидно, процесс метаморфозы связан с большим потреблением холина.

Таблица 3

Потеря холина в яйцах насекомых во время инкубации в *мг*%

Насекомое	*мг* % холина в начале инкуб.	*мг* % холина в конце инкуб.	Потеря холина в %
Шелкопряд	87	27	68
Шершень	203	16	92
Пчела	1052		

Таблица 4

Содержание холина в личинках рабочих пчел в *мг* %

Дни после кладки яиц	1	11	13	19	21
Холин	677	402	394	802	44

ДИНАМИКА ХОЛИНА В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ ПТИЦ

В нашей лаборатории исследовалась динамика холина в эмбриогенезе некоторых видов птиц, а именно: кур, уток, голубей и волнистых попугайчиков. Эти анализы показывают, что во время инкубации происходит интенсивный обмен холина (рис. 4).

В яичках исследуемых птиц до начала инкубации было примерно одинаковое содержание холина. В яйцах кур и уток содержание холина резко падает только на последнем этапе инкубации, когда наблюдается повышенное окисление жиров. В яйцах попугайчиков и голубей динамика холина наблюдается уже в первых стадиях инкубации. На изменение в содержании холина в яйцах влияет корм, который получали птицы (таблица 5).

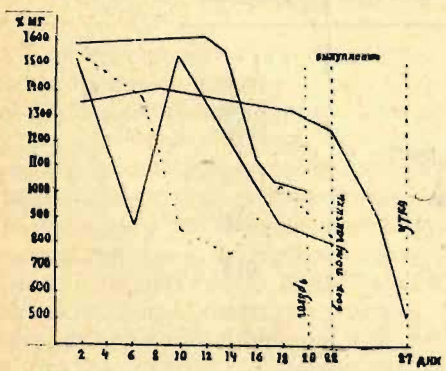


Рис. 4. Динамика холина в яйцах птиц во время инкубации.

Таблица 5

Потеря холина в яйцах кур во время инкубации в %

Рацион кур	День инкубации		
	16	18	21
Растительный белок + + биовит	7	41,8	75—89
Животный белок	0	26,5	57—61
Животный белок + + биовит	0	10	49—51

Как видно из 5-й таблицы, в яйцах кур, получавших исключительно растительные белки, расходование холина значительно выше, чем в яйцах кур, получавших животные белки.

В опытах с яйцами волнистого попугайчика получены 2 различные кривые динамики холина. В обоих опытах яички были взяты от попугайчиков, получавших различный корм. Очевидно, в этих яйцах было различное содержание витаминов и, возможно, других факторов.

Приведенный материал свидетельствует о том, что на динамику холина в яйцах во время инкубации влияют и факторы состава корма.

Данные о содержании холина в яйцах и икре представлены в таблице 6.

Таблица 6

Содержание холина в яйцах и икре

Вид животного	*мг/%* на сухой вес
Птицы:	
курица	1600
утка	1360
голубь	1605
волнистый попугайчик	1510
Пресмыкающиеся:	
черепаха	541
Земноводный:	
лягушка	618
Рыбы:	
лосось	1500
таймень	1470
Насекомые:	
пчела	1052
шершень	203
шелкопряд	87

ДИНАМИКА ХОЛИНА В ТКАНЯХ ЗАРОДЫШЕЙ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Динамика холина в тканях зародышей млекопитающих прослеживалась на разных стадиях развития.

Данные приведены в таблице вместе с данными по содержанию холина в плаценте.

Таблица 8

Содержание холина в тканях зародышей
(в *мг* % на сухой вес)

		Возраст зародыша										
		дни							недели			
		8	11	13	14	16	25	33	6	7—8	8	16
1	Крыса	900	885			978						
2	Кролик		778	726	735		954	613				
3	Плацента кролика		742	690	530		441					
4	Человек								700	810	902	449
5	Плацента человека								796			

Из данных таблицы 8 видно, что в зародыше, как и в плаценте высокое содержание холина, которое понижается с развитием зародыша.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как показывают наши данные, в эмбриогенезе животных всех классов неизменно участвует холин. В зародыше наиболее высокая концентрация холина в самом начале его развития. Из чего следует, что для начала жизни необходима среда с высокой концентрацией холина. В яйцах и икре птиц, пресмыкающихся, земноводных, рыб и насекомых для развития молодого организма депонируются относительно большие количества холина. В том случае, когда его мало, например, в яйцах шелкопряда, личинка сразу после вылупления получает большое количество холина, поедая листья тутового дерева, содержащие больше 100 *мг*% на сухой вес. В личинке до стадии куколки содержание холина увеличивается почти в 20 раз. Еще большим количеством холина для начальных стадий онтогенеза обеспечивают себя пчелы, хотя их яички

содержат много холина (1052 *мг*%), личинки после вылупления питаются молочком и пергой, которые также богаты холином.

В икре рыб к концу инкубации количество холина возрастает. Очевидно, он синтезируется. Одновременно холин также потребляется, о чем свидетельствует активность холиноксидазы в икре лосося и тайменя. Динамика активности холиноксидазы очень своеобразна. До вылупления личинок она достигает своего первого максимума, вскоре после вылупления она у личинок лосося падает до 0, а затем опять повышается, образуя второй максимум. Надо думать, что такой ритм активности холиноксидазы соответствует стадийности развития зародыша. Фермент фосфолипаза А, который в яйцах отщепляет холин от лецитина, активен уже в самом начале инкубации. В яйцах морского ежа уже 30 минут после оплодотворения увеличивается количество свободного холина. В следующие 8 часов до стадии 16 клеток количество свободного холина падает, а затем опять возрастает до стадии плутеуса (10-й день). Гидролиз лецитина можно представить схематически:

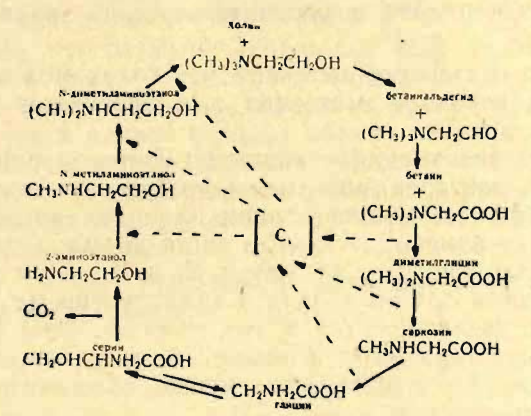
$$\text{лецитин} \xrightarrow{\text{фосфолипаза А}} \text{лизолецитин} \xrightarrow{\text{фосфолипаза В}} \text{глицерофосфорилхолин}$$

$$\xrightarrow{\text{ГФНдиэстераза}} \text{холин} \xrightarrow{\text{холинацетилаза}} \text{ацетилохолин} \qquad (4)$$

Свободный холин в этом случае используется для синтеза ацетилхолина.

Холин является важным компонентом в обмене жиров зародыша. Жиры становятся главным источником энергии в более поздних стадиях эмбриогенеза, когда, например, обмен зародыша птиц переходит на функцию печени. В этом периоде расходуется и много холина. У зародышей цыплят это происходит после 15 дней инкубации. Фосфолипиды, транспортируемые из желточного мешочка в печень, сразу распадаются до продуктов, из которых синтезируются новые фосфолипиды или окисляются с освобождением энергии. Предположительно, что жирные кислоты в печени зародышей цыплят окисляются путем β-окисления. Образующееся ацетильное производное КоА дальше окисляется через трикарбоновые кислоты.

При гидролизе лецитина и окисления жирных кислот освобождается холин, который в дальнейшем распадается. В яйцах птиц, пресмыкающихся, земноводных и насекомых к концу инкубации содержание холина уменьшается. Катаболизм холина начинается под возбуждением холиноксидазы, которая его превращает в бетаинальдегид. Последний окисляется в бетаин и дальше деметилируется в глицин.



Это подтверждается тем, что в курином яйце начиная с 12 по 20 инкубационный день содержание глицина увеличивается с 218 до 410 *мг* [5]. За этот же период расходуется значительное количество холина.

Хотя глицин по своему строению является простейшей аминокислотой, его промежуточный обмен представляет крайне сложную картину. В ходе своего обмена глицин подвергается превращениям в другие аминокислоты, в компоненты нуклеиновых кислот, порфиринов (гема), мочевой кислоты, креатина, липидов и углеводов.

С пятого дня развития в печени куриного эмбриона синтезируется мочевая кислота из глицина, глутамина, муравьиной кислоты и бикарбоната. Интенсивность биосинтеза мочевой кислоты повышается параллельно активности ксантиноксидазы [6]. Известно также, что у зародышей морского ежа, амфибий и у молодых куриных зародышей синтез ДНК может происходить за счет таких простых предшественников, как глицин или аденин [7, 8, 9, 10, 11]. После того как в печени и почках были открыты реакции переаминирования с участием серина, стало вероятным, что одним из промежуточных продуктов обмена серина может служить β-оксипирови-

ноградная кислота, которая дальше дает глицериновую кислоту.

Серин $\rightleftarrows$ β-оксипировиноградная кислота $\rightleftarrows$ -глицериновая кислота. Последняя в свою очередь может стать структурным компонентом липидов.

Лабильные метильные группы, которые отщепляются от бетаина, могут участвовать в различных реакциях переметилирования и так же как C_1 — фрагменты могут служить исходным материалов в биосинтезе весьма различных веществ.

Из всего сказанного вытекает, что холин можно рассматривать как исходный материал для биосинтеза различных веществ.

Расходование холина в яйцах во время инкубации зависит от ряда факторов, которые содержатся в яйцах. Об этом свидетельствует динамика холина во время инкубации. На эту динамику влияют составные части корма, в первую очередь фолиевая кислота, витамины B_6 и B_{12}. При недостатке этих витаминов потери холина в яйцах во время инкубации значительно увеличиваются, и это, кажется, одна из главных причин гибели зародышей и низкого % вылупления. Поэтому при рациональном птицеводстве нужно обеспечить содержание этих витаминов в корме.

В яйцах кур, получавших исключительно растительные белки, расходование холина значительно выше, чем в яйцах кур, получавших животные белки. В этом случае зародыши чаще погибают из-за ожирения печени, что показывает на дефицит холина.

Установлено увеличение содержания холина в куриных яйцах в ранние сроки высиживания при введении витамина B_{12} (0,15 *мг*). Это обусловлено, главным образом, повышением биосинтеза холина в желтке. У цыплят, вылупившихся из яиц, в которые был введен витамин B_{12}, снижение содержания холина происходит медленнее, чем у контрольных цыплят [12]. Было также показано [12], что введение 0,1 *мг* витамина B_6 в подлежащее инкубации куриное яйцо существенно стимулирует образование холина. С другой стороны, если в контрольном яйце общее содержание холина продолжало возрастать вплоть до 18-го дня инкубации, в яйцах с инъекцированным витамином B_6 достигало максимума на 11-й день инкубации и больше не повышалось.

В других условиях протекает развитие зародышей млекопитающих, которые необходимые для образования тканей вещества получают через плаценту. Все же в ранних стадиях и зародыш и плацента содержат относительно много

холина. Так же как и при развитии птиц, при дальнейшем развитии зародышей млекопитающих концентрация холина уменьшается. Понижение содержания холина наблюдается и в плаценте. Дефицит холина в диете беременного животного оказывает влияние на эмбриогенез, зависящее от возраста зародыша. По данным В. М. Дубнова [13] холиновое голодание в первые дни беременности нарушает ее течение, вызывает изменения в плаценте и резорбцию эмбрионов. Бесхолиновое питание крыс, начиная с 9—10 дня беременности, не препятствует сохранению последней.

Очевидно, что развитие зародышей всех видов животных начинается в среде с высокой концентрацией холина. Универсальное распространение холина в органах размножения и его участие в ранних стадиях обмена веществ зарождение свидетельствует, что это филогенетически очень древний компонент обмена. Определение его значения в различных типах обмена веществ и образования органов еще требует дальнейших исследований.

В этой работе участвовали дипломанты Р. Карклинь, И. Звиргзд и Т. Томсоне.

ВЫВОДЫ

1. В яйцах и икре птиц, пресмыкающихся, земноводных, рыб и насекомых накапливается относительно большое количество холина. В тех случаях, когда холина мало, как, например, в яйцах шелкопряда, у личинки содержание холина увеличивается в 20 раз за счет холина, содержащегося в листьях тутового дерева. Личинки пчел развиваются, окруженные кормом, богатым холином.

2. Холин в яичках и икре во время эмбриогенеза является не только пассивным стройматериалом для образования форфатидов, но и участвует в обменных процессах, распадаясь и синтезируясь вновь. К концу инкубации количество холина в яйцах и икре птиц, насекомых и земноводных уменьшается, в икре же рыб увеличивается. Период интенсивного потребления холина в эмбриогенезе птиц и насекомых совпадает с периодом использования жиров в качестве источника энергии, а увеличение содержания холина в икре рыб сопровождает биосинтез липидов.

3. Активность холиноксидазы в конце инкубации в икре рыб колеблется. Первый максимум она достигает до, а второй — после вылупления мальков.

4. На динамику холина в яйцах влияют составные части корма, особенно фолиевая кислота, витамин B_{12} и B_6. При недостатке этих факторов потеря холина во время инкубации может быть столь великой, что может стать одной из главных причин гибели зародыша.

5. В зародышах млекопитающих и плаценте относительно высокая концентрация холина, которая уменьшается с развитием зародыша.

6. Универсальное распространение холина в среде, где происходит эмбриогенез животных, и участие его в начальных стадиях обмена веществ зародыша свидетельствует, что это филогенетически очень древний компонент обмена веществ, который связан с протеканием основных процессов, особенно с обменом липидов и азотистых веществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Э. Циеленс. Биохимия, 18, в. 5, 566, 1953.
2. Э. Циеленс. Труды биохимич. конф. прибалтийских республик Тарту, 125, 1961.
3. E. Cielēns, Latvijas PSR Zin. Ak. Vēstis 9; 53, 1949.
4. H. Numonoi, Chem. Z-blatt, 5102, 1963.
5. T. Osamy, A. Hideo, F. Shinsaku, J. Osaka. Med. Coll. 19 N3, 1958.
6. К. А. Дрель. Первый Всесоюзный биохимический съезд, 1964, вып. 11, 13.
7. J. Brachet, L. Ledoux, Exp. Cell Res., suppl. 3, 27, 1955.
8. P. Grant, Biol. Bull., 199, 543, 1955.
9. P. Grant, J. Cell comp. Physiol., 52, 227, 249, 1958.
10. C. V. Harding, W. L. Hudges, Biol. Bull, 115, 372, 1958.
11. R. Tencer, J. Embryol. exp. Morphol., 6, 117, 1958.
12. K. Yasumoto, J. Osako, Med, Coll, 19, 415, 1959.
13. М. В. Дубнов. Казанск. мед. ж., 4, 67, 1959.

УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ ЛАТВИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА
им. П. СТУЧКИ, т. LXVII. 1965. ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И БИОХИМИЯ, № 9

Ассистент В. ЭГЛЕ, доц. Э. ЦИЕЛЕНС.

БИОСИНТЕЗ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ *N'*-МЕТИЛНИКОТИНАМИДА В ТКАНЯХ ЖИВОТНЫХ

В последнее время установлено, что в тканях животных и растений происходит процесс трансметилирования. Это — цепь биохимических реакций, при которых метилируются многие органические вещества, как, например, гистидин, гомоцистеин, урацил, гуанидинуксусная кислота и др. Амид никотиновой кислоты в организме человека и животных также подвергается метилированию с образованием *N'*-метилникотинамида [*N'*-МНА].

В 1940 году Наяр и Вуд [1] обнаружили в моче неизвестное вещество, количество которого увеличивалось при оральной даче никотиновой кислоты и никотинамида.

Это вещество впервые из мочи выделили Хафф и Перлцвейг [2] и определили, что это *N'*-МНА.

Немного позже Перлцвейг и Бернгейм констатировали, что при инкубации срезов печени крыс с амидом никотиновой кислоты синтезируется *N'*-МНА. Добавляя метионин, синтез *N'*-МНА усиливается [3].

По данным Кантони, синтез *N'*-МНА у высших животных осуществляется постепенно по следующим стадиям [4]:

[1] *l*-метионин + АТФ $\xrightarrow{Mg^{++}}$ *S*-аденозилметионин + + H_3PO_4;

[2] *S*-аденозилметионин + никотинамид → *N'*-МНА + + *S*-аденозилгомоцистеин;

---

[3] *l*-метионин + АТФ + никотинамид → *N'*-МНА + *S*-аденозилгомоцистеин + H_3PO_4.

Эти реакции катализируют ферменты: АТФ — *l*-метионин — *S*-аденозилтрансфераза [2.4.2.13] и *S*-аденозилметионин-никотинамидметилтрансфераза [2.1.1.1] [5].

Исследования Кантони показывают влияние различных факторов на синтез *N'*-МНА *in vitro* в гомогенате печени крыс и определяют непосредственного донора метильных групп.

Таблица 1

Влияние различных факторов на синтез N'-МНА *in vitro* в печени крыс (4)

№	Добавка	N'-МНА γ/г
1	—	2,3
2	*l*-метионин 0,021 М	16,1
3	*d, l*-гомоцистеин 0,005 М	4,7
4	бетаин 0,01 М	2,35
5	холин 0,01 М	2,35
6	гомоцистеин+бетаин	14,2
7	гомоцистеин+холин	4,7

Из таблицы № 1 видно, что метионин увеличивает синтез *N'*-МНА в 8 раз. Отсюда следует, что непосредственный донор метильной группы никотинамиду — *l*-метионин. Как известно, метильную группу в процессе переметилирования переносит активный метионин или *S*-аденозилметионин.

Добавляя гомоцистеин, количество *N'*-МНА увеличивается только в два раза. Очевидно, в системе ограниченное количество метильных групп, необходимых для метилирования гомоцистеина в метионин.

Добавляя только холин или бетаин, количество *N'*-МНА не возрастает, это доказывает, что эти вещества не являются непосредственными донорами метильных групп.

При одновременной добавке гомоцистеина и бетаина значительно увеличивается синтез *N'*-МНА. Бетаин является донором метильной группы для гомоцистеина, который, метилируясь, превращается в метионин.

При одновременной добавке гомоцистеина и холина синтез *N'*-МНА увеличивается только в два раза. Предположительно, что холин сначала окисляется в бетаин, который является донором метильной группы для гомоцистеина. Это ферментативные реакции, которые катализируют несколько ферментов. Первым ферментом, участвующим в цепи этих реакций — холиноксиредуктаза [1.1.99.1], который превращает холин в бетаинальдегид. После этого фермент бетаинальдегид бетаинальдегид-НАD-оксиредуктаза [1.2.1.8] превращает бетаинальдегид в бетаин. Фермент бетаин — *l*-гомоцистеин-метилфераза [2.1.1.5] катализирует перенос метильной группы с бетаина на гомоцистеин [5].

Вопрос об источниках метильных групп для биологического метилирования никотинамида нельзя считать полностью решенным.

Исследования Черкеса [6] показывают, что биологическое метилирование никотинамида может осуществляться не только метильными группами метионина пищи, но и метильными группами, которые образуются эндогенно в организме.

N'-МНА выделяется с мочой и при недостаточности белков (лимитирующих количество метильных групп) и при полном голодании. Эндогенно образовавшиеся метильные группы могут обеспечить метилирование даже повышенных доз никотинамида.

Эти наблюдения совпадают с данными Саррети и Перлцвейга [7], а также Тихомировой [8], которые наблюдали повышенное выделение *N'*-МНА у крыс при недостаточности белков (4,5%).

Имеются доказательства, что кишечная флора участвует в метилировании никотинамида, т. к., ослабляя деятельность кишечной флоры сульфаниламидными препаратами, уменьшается *N'*-МНА в моче [6].

Исследования Шарпенака и Данилова [9] показывают, что в случае болезни, когда с мочой выделяется повышенное количество *N'*-МНА, его можно нормализовать диетой, богатой белками. Повышенное количество *N'*-МНА в моче появляется как следствие недостаточности белков в организме. Таким образом, суточное выделение *N'*-МНА с мочой может служить показателем обеспеченности организма белками.

Избыток никотиновой кислоты в организме показывает антилипотрофный эффект, т. к. синтез *N'*-МНА потребляет значительное количество метильных групп, задерживает биосинтез холина, в результате чего в организме появляются патологические процессы — накопление жиров и понижение уровня гликогена в печени [10].

На процесс метилирования никотинамида влияет ряд факторов, из которых надо отметить витамины B_6 и B_{12}, при недостатке которых в организме крыс понижается интенсивность синтеза *N'*-МНА. Вопрос о роли витамина B_{12} в процессе трансметилирования окончательно не решен. Считают, что B_{12} участвует в переносе лабильных метильных групп с бетаина на гомоцистеин [11].

Кроме того, существует мнение, что витамин B_{12} участвует в синтезе лабильных метильных групп в животных тканях из β-углеродного атома серина, α-углерода глицина и формальдегида [12].

Витамин B_6 на метилирование никотинамида влияет косвенно. При недостатке витамина B_6 задерживается всасыва-

ние B_{12} из кишечного тракта [11]. Кратковременный недостаток витамина B_6 не влияет на процесс метилирования.

На метилирование никотинамида влияет также функциональное состояние щитовидной железы. При введении крысам тиоурацила метилирование никотинамида происходит менее интенсивно, чем при нормальной деятельности щитовидной железы [13].

При облучении крыс лучами рентгена повышается выделение *N'*-МНА с мочой. Облучая гомогенат печени *in vitro*, час после облучения интенсивность синтеза *N'*-МНА резко понижается, а 20—24 часа спустя возрастает [14].

Черкес наблюдал зависимость между обменом никотиновой кислоты и серосодержащими аминокислотами. При повышенных дозах с пищей цистина, цистеина и метионина *N'*-МНА с мочой выделяется значительно меньше [15]. Отсюда следует, что обмен этих аминокислот, возможно, связан с усиленным использованием никотиновой кислоты.

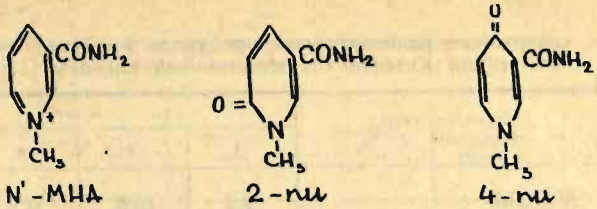
Опытами *in vitro* установлено, что в гомогенатах печени крыс интенсивность синтеза *N'*-МНА из никотиновой кислоты понижается при добавлении гуанидинуксусной кислоты [16]. Как известно, гуанидинуксусная кислота в организме животных метилируется с образованием креатина. В данном случае имеющиеся в гомогенате печени метильные группы не могут обеспечить одинаково интенсивное метилирование никотинамида и гуанидинуксусной кислоты.

В организме высших животных витамин PP синтезируется из триптофана [17].

Синтез витамина PP из триптофана представляет собой цепь биохимических превращений, где как промежуточные продукты появляются кинуренин, 3-гидроксикинуренин, 3-гидроксиантраниловая кислота и хинолиновая кислота. Инъекция хинолиновой кислоты крысам в три раза увеличивает количество *N'*-МНА в моче по сравнению с нормой [18].

Процесс метилирования в организме насекомых совсем мало изучен. Личинкам рисовой моли *Corcyra cephalonica* с пищей вводились никотиновая кислота и никотинамид с меченым C_{14} в нормальном 25γ/г и повышенным 490 γ/г количествах. В обоих случаях продукт выделения — свободная никотиновая кислота и *N'*-МНА не обнаружен [19].

N'-МНА не единственный метилированный продукт никотинамида. В моче человека и других млекопитающих обнаружены и изолированы *N'*-метил-2-пиридон — 5-карбоксамид (2-пи) и *N'*-метил-4пиридон — 5-карбоксамид (4-пи), которые представляют собой продукты окисления *N'*-МНА.



4-пи впервые Джонсон обнаружил в моче крыс [20]. Вводя крысам никотиновую кислоту с меченым C_{14} и следя за качественным и количественным содержанием радиоактивных продуктов в моче, получены следующие результаты:

Таблица № 2 (20)

%-ное содержание радиоактивных веществ в моче крыс после инъекции меченой C^{14} никотиновой кислоты.

№	Радиоактивные продукты в %	Дни									
		1	2	3	4	5	6	7	10	13	15
1	N'-МНА	27,2	10,4	17,5	13,2	11,7	8,2	6,7	5,4	2,5	3
2	Никотиновая к.	13,0	1,5	1,0							
3	Никотинуровая к.	33,6	4,5	2,5							
4	4-пи	22,3	69,2	70,0	74,3	70,5	76,6	79,2	87,2	79,9	94,4
5	2-пи	4,1	10,5	8,9	12,2	14,7	11,0	10,0	5,2	17,9	2,6
6	Никотинамид	0,04	3,8	0,2	0,3	3,1	4,2	4,1	2,3		

Из таблицы № 2 видно, что основным продуктом обмена никотиновой кислоты в организме крыс является 4-пи, которого выделяется больше всего. 4-пи продолжает выделяться в повышенных количествах длительное время. Авторы приходят к выводу, что в организме крыс 4-пи образуется при распаде НАД. Вводя крысам *N'*-МНА с меченым C_{14}, выделение 4-пи с меченым C_{14} не наблюдается. Значит, не происходит окисления *N'*-МНА в 4-пи. Думается, что в организме из свободного никотинамида образуется *N'*-МНА, который частично окисляется в 2-пи.

4-пи и 2-пи обнаружены в моче человека и обезьян, а также в плазме крови человека [21, 22]. Предполагается, что в организме человека 4-пи образуется при распаде НАД, а 2-пи, очевидно, из свободного, не связанного в ферментные системы никотинамида.

При оральной даче человеку больших доз (100 *мг*) никотиновой кислоты через 24 часа в моче обнаружено небольшое повышение содержания 4-пи, но значительное повышение содержания 2-пи. В организме же обезьян конечные продукты обмена никотиновой кислоты в моче появляются в других соотношениях.

Таблица № 3

%-ное содержание радиоактивных продуктов в моче обезьян после инъекции меченой C_{14} никотиновой кислоты [21]

№	Радиоактивные продукты в %	Дни			
		2	4	6	8
1	*N'*-МНА	2,2	10,6	18,8	7,9
2	Никотиновая кислота	17,4	8,5		
3	Никотинуровая кислота	2,9	1,1		
4	4-пи	11,0	8,5	7,0	7,8
5	2-пи	65,2	64,8	73,0	76,6
6	Никотинамид	1,3	6,4	1,2	7,7

Из таблицы № 3 видно, что при инъекции обезьянам меченой C_{14} никотиновой кислоты с мочой длительно выделяется 2-пи. Это доказывает, что последний образуется при распаде НАД.

В 1961 году Бонавита и Народ впервые обнаружили в моче мышей новый продукт обмена витамина PP — *N* — окись никотинамида [23].

Инъекции никотинамида в больших концентрациях повышают уровень НАД в печени в 8—10 раз, а в присутствии азасерина количество НАД уменьшается в 3—4 раза. Это доказывает, что азасерин ингибирует включение никотинамида в состав НАД.

Мыши, которым одновременно ввели никотинамид меченый C_{14} и азасерин, выделяют с мочой меньше *N*-окись никотинамида, чем в случаях исключения азасерина.

В тех случаях, когда вводился никотинамид меченый C_{14} с азасерином, наблюдается повышение количества *N'*-МНА и свободного никотинамида в моче.

Авторы, опираясь на эти опыты, заключают, что в организме мышей *N'*-МНА образуется из никотинамида, который не включается в состав НАД. Из всего сказанного вытекает, что при распаде НАД в организме мышей образуется *N*-окись никотинамида.

В 1962 году, применяя радиоактивные изотопы, проследили за продуктами обмена никотиновой кислоты в моче овец и свиней [24].

Из таблицы № 4 видно, что после 8,25 часа в моче овец содержится только никотинамид с меченым C_{14}, который продолжает выделяться 45 дней. Авторы заключают, что никотинамид в организме овец образуется при распаде НАД. Тригонеллин, которого немного обнаружили в моче, мог бы образоваться из *N'*-МНА в мочевом пузыре, где щелочная среда.

Таблица № 4

%-ное содержание радиоактивных продуктов в моче овец после введения никотиновой кислоты меченой C_{14} [24].

Через часы после введения	N'-МНА	Тригонеллин	Никотинуровая к.	Никотиновая к.	Никотинамид
0—1,25	0,3	0,3	61,9	36,2	1,3
1,25—4,25	0,3	0,2	29,8	67,8	1,9
4,25—8,25	3,0	—	1,8	89,3	5,9
8,25—24	—	—	—	—	100
88—96	—	—	—	—	100

Однако в моче свиней основными продуктами обмена витамина PP являются 2-пи, 4-пи и N'-МНА. Считают, что 2-пи и 4-пи образуются при распаде НАД.

Чанг и Джонсон [25] определяли конечные продукты обмена никотиновой кислоты в моче цыплят.

Констатированы следующие соединения, образовавшиеся от введенной никотиновой кислоты, меченой C_{14}:

1. β-никотинил-*d*-глюкуроновая кислота,
2. никотинуровая кислота,
3. α-никотинилорнитин,
4. δ-никотинилорнитин,
5. никотиновая кислота,
6. 2,5-диникотинилорнитин,
7. никотинамид.

В моче цыплят не найдены метилированные продукты никотиновой кислоты.

Как видно из обзора литературы, у животных различных видов очень разнообразные продукты обмена витамина PP.

Широко развернулись исследования о N'-МНА в клинической биохимии.

При некоторых патологических состояниях нарушается процесс переметилирования.

Изучение этих процессов представляет интерес не только потому, что позволяет определить ход обмена веществ с различных точек зрения, но и потому, что помогает разъяснить диагностику и лечение некоторых заболеваний.

О возможности организма осуществлять реакции переметилирования частично можно судить по количеству метилированных продуктов никотинамида в суточной моче.

Радкевич [26] изучал обмен витамина PP у детей, больных туберкулезом суставов, которых лечили стрептомицином, фтивазидом и ПАСК. В этом случае выделяется гораздо

меньше N'-МНА, чем в норме. При добавочной даче витамина PP количество N'-МНА в моче повышается. Предполагается, что у больных туберкулезом нарушен обмен белков. В острой стадии туберкулеза суставов нарушена также синтетическая и антитоксическая функция печени.

При инфекционном гепатите, когда нарушена нейрогуморальная регуляция печени и обмен витамина PP, в сутки с мочой выделяется в два раза больше N'-МНА, чем в норме. Авторы объясняют это нарушениями в синтезе НАД и усиленным распадом белков в печени [27].

Борисова [28] изучала обмен витамина PP у больных брюшным тифом, у которых во время болезни наблюдался гиповитаминоз витамина PP, хотя в пище содержалось 9—15 *мг* витамина PP в сутки. При острой стадии брюшного тифа с мочой выделяется значительно больше N'-МНА, но уменьшается количество НАД в крови. При даче больным дополнительно 200 *г* творога (соотв. 28 *г* белка) количество N'-МНА в моче и количество НАД в крови приходят в норму.

Об обеспеченности организма витамином PP при анациодном гастрите судят по количеству НАД в крови и N'-МНА в суточной моче.

По данным Чунаковой [29], у больных наблюдается пониженный уровень НАД в крови и повышенное количество N'-МНА в суточной моче, хотя больные получали с пищей 15—20 *мг* витамина PP ежедневно.

После однократного приема нагрузочной дозы витамина PP в 100 *мг* последняя почти полностью задерживалась в организме. Скорость выделения N'-МНА с мочой за первые 6 часов после приема 100 *мг* витамина PP была понижена. Давая больным дополнительно к полноценному питанию 50 *мг* витамина PP ежедневно в течение 10 дней, состояние больных заметно улучшалось и недостаточность витамина PP уменьшалась.

В моче человека определялись количества N'-МНА и 2-пи, и обнаружено, что у недоношенных детей отношение N'-МНА к 2-пи в суточной моче всегда больше одного. У взрослых же людей это отношение всегда меньше одного [30, 31].

Установлено, что экскреция 2-пи с мочой выше у детей, рожденных в срок, чем у недоношенных детей.

Авторы предполагают, что у недоношенных детей способность ферментативных систем, связанных с превращением N'-МНА в 2-пи, более ограничена по сравнению с детьми, рожденными в срок.

Из обзора литературы видно, что одним из путей обмена витамина PP является его метилирование, в результате чего с мочой выделяются N'-МНА и пиридоны — 2-пи и 4-пи. Ко-

личественное соотношение этих веществ сильно колеблется у разных видов животных и при различных патологических отклонениях у человека, и их определение может служить для диагностики некоторых заболеваний.

Особенно важно учесть процесс метилирования никотинамида в тех случаях, когда с терапевтической целью принимаются большие дозы витамина PP, что может привести к симптомам авитаминоза холина.

Одновременно нужно отметить, что в литературе нет данных о биосинтезе *N'*-МНА в органах животных, за исключением некоторых работ о печени.

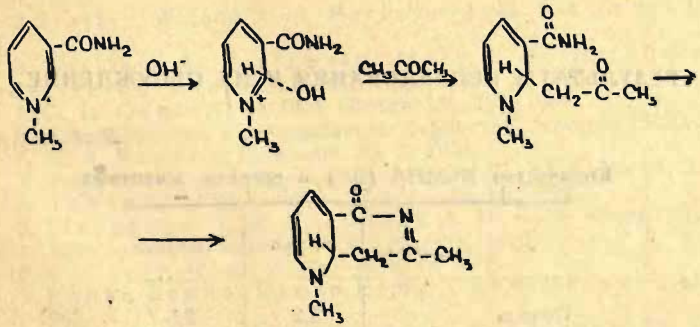
В данной работе ставилась задача количественно определить *N'*-МНА в различных органах животных. Исследовались 8 органов кошек, голубей, лягушек и цыплят, и во всех обнаружен *N'*-МНА.

ПРИНЦИП МЕТОДА

В 1947 году Хафф и Перлцвейг опубликовали метод определения *N'*-МНА в моче, который основан на флюоресценции продукта конденсации *N'*-МНА с ацетоном [33].

N'-МНА в виде квартернарного иона не активен, но в щелочной среде он превращается в α-карбинольную форму, которая с ацетоном дает продукт конденсации, который в ультрафиолетовом свете дает интенсивно голубую флюоресценцию.

Механизм реакции нижеследующий:



В 1947 году Швейгерт обнаружил, что продукты конденсации индола, скатола и др. с ацетоном также дают голубую флюоресценцию, что увеличивает результаты анализов.

Чтобы этого избежать, вместо ацетона нужно пользоваться метилэтилкетоном [34].

Основываясь на вышеуказанный метод, дополняя его новейшими наблюдениями и приспосабливая к конкретным условиям, определялось содержание *N'*-МНА в тканях животных.

МЕТОДИКА

Охлажденные ткани гомогенизировали в охлажденной ступке, *N'*-МНА экстрагировали 0,1 н HCl, центрифугировали и осаждали белки 10% раствором трихлоруксусной кислоты. Выпавший осадок центрифугировали и центрифугат пропускали через ионообменную смолу «Декалсо», которая избирательно адсорбирует *N'*-МНА. Перед каждым анализом «Декалсо» нужно активировать. Сперва ее обливают 0,1 н HCl и оставляют на 12 часов. Затем ее обливают 25% KCl и нагревают в водяной бане при 80° в течение 30 минут. Затем полоскают горячей 0,1 н HCl в течение двух часов и после этого прополаскивают дистиллированной водой до тех пор, пока фильтрат не даст положительную реакцию на ион хлора.

Таким образом подготовленный адсорбент заполняют в колонну длиной в 20 *см*, диаметром в 1,5 *см* с суженным книзу концом.

Анализ пропускают через колонну со скоростью, не превышающей 2 *мл* в минуту. Адсорбированный *N'*-МНА из колонны элюируют 25% KCl. Полученный элюат в дальнейшем используют для определения *N'*-МНА по вышеуказанному методу Хаффа и Перлцвейга.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Таблица № 5

Количество N'-МНА (γ/г) в органах животных

	Кошка	Лягушка
Печень	3,2	2,5
Почка	2,8	2,3
Мышцы ног	1,5	2,4
Грудные мышцы	1,6	2,1
Мышцы сердца	1,9	2,1
Селезенка	1,2	1,7
Панкреас	1,1	
Мозг	1,3	2,1

Результаты анализов показывают, что биосинтез *N'*-МНА имеет место в различных органах животных. Наибольшие количества *N'*-МНА в печени и почках. В остальных органах примерно одинаковое содержание *N'*-МНА. Это доказывает, что метилирование витамина PP имеет место в различных органах.

ВЫВОДЫ

С мочой животных выделяется продукт метилирования витамина PP — *N'*-МНА. В последнее время его определяют в моче для характеристики обеспеченности организма белками и витамином PP, а также для характеристики некоторых патологических состояний. Однако до сих пор не было известно, в каких органах происходит его синтез, но имеются данные, что *N'*-МНА синтезируется и кишечной флорой.

Взяв за основу модифицированный Швейгертом и Карпентером метод определения *N'*-МНА в моче Хаффа и Перлцвейга, его приспособили для количественного определения *N'*-МНА в тканях животных. Анализируя 8 органов (кошки, лягушки), найдено, что метилирование витамина PP имеет место в различных органах весьма интенсивно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Najjar V. A. and Wood, R. W. Proc. Soc. Exp. Biol, and Med., 44, 386, 1940.
2. Huff, J. W., and W. A. Perlzweig, «J. Biol. Chem.» 150, 395, 1943.
3. William A. Perlzweig, Mary L. C. Bernheim and Frederick Bernheim. «J. Biol. Chem.» 150, 2, 1943.
4. C. L. Cantoni «J. Biol. Chem.» 189, 203, 1951.
5. Классификация и номенклатура ферментов, Москва, 1962.
6. Л. А. Черкес. Биохимия, 23, 3, 1958.
7. Sarrett H., Klein R., Perlzweig W., «J. Nutr.» 24, 295, 1942.
8. Тихомирова А. Вопр. питания, II, 66, 1952.
9. Шарпенак А. Э., Данилова А. И. В сб. «Совр. данные по лечебн. применению витаминов». М., Медгиз, 1960.
10. S. Conte. «Chem. Abstr.» 1955, 49, 9116.
11. Ranke Bruno, Ranke Elma, Chow Bacon F., «J. Nutr.» 76, 4, 1962.
12. Arnstein, H. R. V. Biochem. Soc. Symposia, 92, 13, 1955.
13. Черкес Л. А. Вопр. питания, XIII, I, 1954.
14. Nerurkar, M. K. Sahasrabudhe M. B, «Internat. J. Radiat. Biol.» 2, 2, 1960.
15. Л. А. Черкес, Н. М. Фильчагин, А. А. Дилерман. «Биохимия», 140, 20, 1955.
16. S. Fabro «Acta Vitaminolog.» 16, 61—64, 1962.

17. Rosen F., J. W. Huff and W. A. Perlzweig, «J. of Biol. Chem.» 163, 1946.
18. Henderson, L. M., Ramasarma, G. B. and Johnson, B. C. «J. Biol. Chem.» 181, 677, 1949.
19. Rajagopalan K. V., Sundaram T. K., Sarma P. S. «Bioch. J.» 2, 74, 1960.
20. M. L. Wu Chang and B. Connor Johnson, «J. Biol. Chem.» 234, 7, 1959.
21. Denis Abelson, Ardit hanne Boyle and H. Seligson «J. Biol. Chem.» 238, 2, 1963.
22. M. L. Wu Chang and B. Connor Johnson. «J. Biol. Chem.» 236, 7, 1961.
23. Vincenzo Bonavita, Stjuart A. Narrod and Nathan O. Kaplan, «J. Biol. Chem.» 236, 3, 1961.
24. M. L. Wu Chang and B. Connor Johnson, «J. Nutr.» 76, 4, 1962.
25. M. L. Wu Chang and B. Connor Johnson, «J. Biol. Chem.» 226, 1957.
26. Р. А. Радкевич. «Современные данные по лечебному применению витаминов», Медгиз, 1960.
27. Старшов П. Д. «Вопр. мед. химии», 2, 8, 1962.
28. Борисова М. А. «Вопр. питания», 3, 19, 1960.
29. Чунакова Е. П. «Вопр. питания», 4, 22, 1963.
30. Careddu P., Mainardi L., «Acta vitaminol.» 6, 15, 1961,
31. Tenconi L. T., Nicolis F. B., Mainardi L. «Boll. Soc. ital. biol. sperim.» 24, 37, 1961.
32. Apollonio T., Careddu P., Mainardi L., Sacchetti G., Tenconi L. T. «Acta vitaminolog.» 2, 17, 1963.
33. Huff, J. W., Perlzweig W. A. «J. Biol. Chem.» 1947, 167, 157.
34. Schweigert B. S. «Science» 522, 106, 1947.

УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ ЛАТВИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА
им. П. СТУЧКИ, т. LXVII. 1965. ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И БИОХИМИЯ, № 10

Старший преподаватель АПИНИС А. П.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ОТХОДОВ ПРОМЫШЛЕННОСТИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВИТАМИНА B_{12} ПУТЕМ ТЕРМОФИЛЬНОГО МЕТАНОВОГО БРОЖЕНИЯ

Постановлением ЦК КПСС и Совета Министров СССР «О мерах по дальнейшему развитию биологической науки и укреплению ее связи с практикой» предусмотрена разработка технологии производства кормовых витаминов [3].

В кормовом рационе большое значение имеет витамин B_{12}, который повышает усвояемость белков, особенно белков растительного мира. При этом надо иметь в виду, что основную кормовую базу составляют растительные продукты и главным источником белка для животных является растительный белок.

В Институте биологии АН Латвийской ССР под руководством проф. Валдмана установлено, что прибавка в корма витамина B_{12} и биомицина увеличивает усвояемость питательных веществ растительных продуктов и кормовой рацион можно составить совершенно без продуктов животного происхождения. По данным профессора Валдмана, живой вес цыплят и свиней увеличивается гораздо быстрее, чем без этих добавок (у свиней на 29%, цыплят — 20%) [1]. Кроме того, применение витамина B_{12} в кормах дает возможность в 2—3 раза лучше сохранить молодняк [2]. Подобные результаты получены и в других институтах.

Это объясняется тем, что витамин B_{12} участвует в синтезе некоторых незаменимых аминокислот, а также активизирует включение аминокислот в молекулы белка. При недостатке витамина B_{12} синтез белков замедляется и часть аминокислот в синтезе белков не используется. Витамин B_{12} участвует в таких важных процессах, протекающих в организме животных, как синтез метильных групп и метионина, синтез белков и др.

Все это выдвигает задачу перед нашей биохимической промышленностью обеспечить животноводство этим ценным витамином. Поэтому производство витаминов к 1970 году

предусмотрено довести до 1300 *т* в год, в том числе и производство витамина B_{12} [3].

Витамина B_{12} в растительных кормах нет, а корма животного происхождения, содержащие B_{12}, в животноводстве используются мало. Поэтому необходимо освоить производство этого витамина.

Химическое строение витамина B_{12} сложное, и в ближайшее время его получение синтетическим путем не предвидится. Остается биохимический способ его получения. Витамин B_{12} синтезируют некоторые микроорганизмы, из которых и получен чистый витамин B_{12} для медицинских целей. Для животноводства нет необходимости в чистом витамине B_{12}; в корма можно добавлять биомассу, содержащую витамин B_{12}. Полученные результаты при этом даже лучше, чем используя чистый кристаллический витамин B_{12} [1, 2]. Это доказывает то, что в биомассе микроорганизмов содержатся еще и другие биологически активные вещества, которые стимулируют процессы обмена веществ.

До сих пор витамин B_{12} получали главным образом при пропионовокислом брожении. Бактерии пропионовокислого брожения производят сравнительно много витамина B_{12}, но их культивация сложна, ферментационные сосуды нужно готовить из специальной нержавеющей стали, процесс длительный — 4 суток, нужно соблюдать стерильность и во время ферментационного процесса поддерживать определенное pH. Питательный раствор для пропионовокислого брожения содержит глюкозу и кукурузный экстракт. Кроме того, к раствору нужно добавлять соли кобальта и один из промежуточных продуктов синтеза — 5,6-диметилбензимидазол. Это экономически не выгодно, т. к. сбраживаются вещества, которые можно использовать в питании человека. Исходя из этих соображений, для получения витамина B_{12} в больших количествах нужно использовать другие более доступные продукты.

Витамин B_{12} содержится также в актиномицетах (*Actinomyces auriefaciens* и *Act. rimosus*), но в слишком малых количествах, по сравнению с антибиотиками. Эта биомасса используется главным образом источником антибиотиков, а как источник B_{12} малопригодна.

Витамин B_{12} содержится также в илах озер и болот, илах сточных вод и в сапропель, но их использование для корма затруднено, т. к. они содержат вредные соединения.

Из других бактерий, производящих витамин B_{12}, большое перспективное значение имеют бактерии метанового брожения. Эти бактерии встречаются в разных илах и в почве. Чистую культуру метановых бактерий *Methanobacterium*

omelianski выделил Баркер в 1940 году [4, 6]. Позднее выделены и другие культуры: *Methanobacterium formicicum, Methanobacterium barkeri* и *Methanococuss wannelii (5)*.

Метановые бактерии являются обязательными анаэробом; кислород задерживает их развитие.

Метановые бактерии в качестве питательных веществ используют низкомолекулярные органические кислоты и спирты, но не используют углеводы и аминокислоты. На практике не применяют чистое метановое брожение, т. к. ограничена сырьевая база, а также культивирование их в чистом виде довольно трудное. Выгоднее использовать такую смешанную культуру бактерий, живущих в симбиозе, какая встречается в природе. В ней кроме метановых бактерий имеются и бактерии, которые разрушают углеводы, белки и жиры до низкомолекулярных кислот. Конечные продукты последних и используют метановые бактерии. Применение такой смешанной культуры позволяет использовать различные субстраты, содержащие органические вещества; например, барду спиртзаводов, которая остается после дистилляции спирта. Кроме того одновременная культивация различных микроорганизмов сравнительно проста; ферментаторы можно готовить из обычного железа или бетона, не нужно следить за стерильностью, т. к. процесс реализуется при высоких температурах (+55, +56°), при которых деятельность других бактерий затруднена [2]. Метановое брожение начато исследовать с целью найти способ очищения городских фабричных и стоячих вод. Первые исследования принадлежат В. Л. Омельянскому (1902 г.), который установил, что при распаде масляной кислоты путем метанового брожения образуется метан. Большое внимание метановому брожению стали уделять после того, когда В. Фридрихсон и К. Бернхауэр открыли, что в стоячих водах содержится витамин B_{12} (1953 г.) [7]. Нейяр доказал, что витамин B_{12} образуют метановые бактерии. Было установлено, что при образовании метана в результате распада различных органических веществ участвует целая группа бактерий, живущих в симбиозе [8].

При помощи меченых атомов углерода установлено, что метан образуется из CO_2 в процессе восстановления водородом [9, 10].

$$CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$$

Methanobacterium omelianski окисляет этиловый спирт следующим образом:

$$2CH_3{-}\overset{\times}{C}H_2OH + CO_2 \rightarrow 2CH_3COOH + \overset{\times}{C}H_4$$

$$\times \quad \times$$

Меченый атом углерода С из CO_2 теперь в молекуле метана. Аналогично происходит брожение масляной кислоты, и опять CO_2 образует CH_4.

$$2CH_3—CH_3—CH_2—COOH + 2H_2O + CO_2 \rightarrow 4CH_3COOH + CH_4$$

Если при окислении субстрата образуется CO_2, тогда процесс происходит сложнее. Сбраживая пропионовую кислоту с *Methanobacterium propionicum* часть выделившегося CO_2 используется для синтеза CH_4 [11, 15].

$$4CH_3—CH_2COOH + 8H_2O \rightarrow 4CH_3COOH + 4CO_2 + 24H$$

$$3CO_2 + 24H \rightarrow 3CH_4 + 6H_2O$$

$$4CH_3—CH_2COOH + 2H_2O \rightarrow 4CH_3COOH + CO_2 + 3CH_4$$

Установлено, что протекает и другой процесс образования метана.

Methanosarcina разрушает метиловый спирт таким образом [10]:

$$4CH_3OH \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2H_2O$$

При распаде уксусной кислоты метан образуется прямо из метильной, а не из COOH группы [5, 11]:

$$\times \qquad \times$$

$$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2.$$

Следовательно, метан образуется: 1) восстанавливая CO_2 и 2) при распаде метилового спирта и уксусной кислоты. Кислоты, начиная с C_5 метановые бактерии сами разрушать не могут; это осуществляют другие термофильные бактерии. В результате их деятельности образуются низкомолекулярные жирные кислоты, которые используются метановыми бактериями. Образование летучих жирных кислот еще мало изучено.

Оптимальный режим для сосуществования термофильных бактерий следующие: pH 7,5—8,5, температура 55—56° и анаэробные условия. Процесс протекает в два этапа. На первом этапе распадаются углеводы и белки, образуются органические кислоты; аминокислоты дезаминируются, образуя также жирные кислоты; pH понижается. На втором этапе происходит распад образовавшихся кислот и pH повышается. Во время брожения выделяются газы, содержащие метан, углекислый газ, сероводород и др. Этот газ на практике используют как топливо, его теплотворность 5000—6000 *ккал/м*^{3}.

Процесс определяется количеством выделившихся газов, pH среды и количеством летучих кислот.

Илы сточных вод городов и спиртовую барду для получения витамина B_{12} первые стали использовать японцы [8]. Им удалось получить из спиртовой барды биомассу, содержащую 70—90 *мкг* витамина B_{12} на 1 *г* сухого вещества.

В Советском Союзе этот вопрос начали изучать в Институте биохимии им. А. Н. Баха АН СССР под руководством чл. кор. АН СССР В. А. Букина [2]. Разработана технология процесса метанового брожения, которая осуществлена в г. Грозненском. Здесь в качестве субстрата используется барда ацетоно-бутилового брожения. Для ацетоно-бутилового брожения нужен питательный раствор, который содержит 70% меласы и 30% муки.

При термофильном метановом брожении барды, содержащей 2,5% сухого вещества, получают 500 *мкг* витамина B_{12} в 1 литре; а если сухого вещества в барде имеется 5% — 1000 *мкг/л*. В сутки завод сбраживает 40 $м^3$ барды и получают биомассу, содержащую 16 *г* витамина B_{12}. Это количество достаточное для витаминизации 1600 *т* корма, т. к. на 1 тонну корма необходима добавка 10 *мг* витамина B_{12}. Стоимость витамина, необходимого для прибавки к 100 *т* корма, всего 8,3 рубля.

Положительные результаты применения витамина B_{12} в животноводстве выдвинули необходимость производить биомассу, содержащую витамин B_{12}, и в нашей республике. У нас имеется обширная сырьевая база.

На спиртзаводах, где сырьем для производств спирта используется побочный продукт сахарных заводов — меласа, после отделения спирта остается барда, которая содержит 60—70 *г* сухого вещества на 1 литр, который содержит восстанавливающих веществ 0,5—0,8% и золу до 1,5%. А в растворе имеются органические кислоты, глицерин, белки и др. вещества. Кроме того, в нашей республике не полностью используются отходы производства лимонной кислоты и антибиотиков (мицелии грибков — *Aspergillus niger* и др.).

Термофильное метановое брожение в нашей лаборатории начали изучать по предложению конструкторского бюро Совнархоза ЛССР, используя в качестве субстрата барду Милгравского спиртзавода, но в дальнейшем предусматривалось осуществить этот вопрос на практике на Калкунском спиртзаводе. Использование спиртовой барды уже ранее изучали В. Я. Биховский [8], Е. С. Панцхава [11] и Г. А. Никитин [12].

Согласно их исследованиям брожение происходит нормально, если барда содержит 2,5% и 5% сухого вещества и

обмен барды в сутки составляет 10%. В ферментационной жидкости количества витамина B_{12} соответственно 500 и 800 *мгк/л*. Применяя более концентрированную барду и повышая процент обмена барды в сутки, раствор скисает.

В некоторых случаях, добавляя в сутки 10% свежей барды, количество витамина достигало 1000 *мгк/л*.

В опытах, проведенных на Милгравском спиртзаводе, установлено, что в сутки нельзя обменивать более 5—7% свежей барды, содержащей 6—7% сухого вещества. Были случаи, когда и такой состав раствора скисал и метановое брожение приостанавливалось. И даже после нейтрализации карбонатом амония процесс брожения восстановить не удавалось.

Проведя опыты в лаборатории кафедры биохимии, ферментация осуществлялась в колбах на 1000, 500 и 300 *мл* в термостате при температуре 56°. Колбы при помощи резиновых трубок соединялись с газометром, находящимся снаружи для собирания и измерения газов. Ежедневно после взбалтывания колб у различных образцов было взято 5%, 7,5%, 10%, 12,5% и 15% ферментационной жидкости и добавлялось столько же свежей барды, содержащей сухого остатка 60—70 *г/л*. У снятых проб определялся pH, количество летучих кислот по методу Дикло, сухое вещество, высушивая при 105°С до неизменного веса, и количество витамина B_{12} микробиологически с культурой *Escherichia coli* 113—3 в пробирке [14, 15]. Для ферментации применяли барду Милгравского спиртзавода с pH 4,5—5,5 и нейтрализованную с гидратом окиси аммония барду с pH 6,5—7,0; как одному, так и другому составу барды был добавлен дрожжевой автолизат и растертый и автолизованный мицелий.

Проследили также за динамикой брожения в течение суток. Применялась культура термофильных бактерий, полученная из Института биохимии им. А. Н. Баха АН СССР.

В качестве контроля сбраживалась заводская барда с 70 *г* сухого вещества на литр и pH 5,5. Получены следующие результаты:

% обмена свежей барды в сутки	Отношение объема выделившегося газа к количеству обмененной барды	Количество витамина B_{12} в *мгк/л*	Количество летучих кислот в *г*/100 *мл* в перерасчете на CH_3COOH
5	20—25	500	0,4
7,5	20—22	670	0,4
10,0	20—25	770—1300	0,5 и более

Витамин B_{12} определялся пробирочным и чашечным методом.

Обменивая в сутки 5 и 7,5% свежей барды, брожение происходило нормально, pH все время было 8,0—8,5, выделившиеся количества газа примерно одинаковы. Повышая % обмена до 10%, увеличивалось количество летучих кислот, уменьшалось pH, возрастало количество витамина B_{12}.

На десятый день процесс замедлялся и метановое брожение приостанавливалось (pH падал ниже 7,0). Из этого следует, что при добавлении большего количества органического вещества они разрушаются бактериями гниения, и в результате образующихся органических кислот метановое брожение задерживается.

Чтобы устранить скисание и увеличить количество азота, применялась барда, которую нейтрализовали гидратом окиси аммония. Получены следующие результаты:

% обмена свежей барды в сутки	Отношение объема выделившегося газа к количеству обмененной барды	Количество витамина B_{12} в *мгк/л*	Количество летучих кислот в *г*/100 *мл* в перерасчете на CH_3COOH
5	20—25	550	0,4
7,5	20—25	1000	0,4
10,0	20—25	1200	0,5
12,5	20—24	2400	0,5
15,0	17—24	1600—2300	0,7

Брожение нейтрализованной барды происходит интенсивнее, изменение pH в течение суток меньше, % обмена можно увеличить в 2 раза (по сравнению с контролем), количество витамина соответственно большее. Это значит, что, добавляя гидрат окиси аммония, последний нейтрализует образовавшиеся органические кислоты и соли аммония лучше используются.

Чтобы установить влияние дрожжевого аутолизата на термофильное метановое брожение, к барде добавляли дрожжевой автолизат в количестве 5% от сухого вещества в растворе. Применялась нейтрализованная и ненейтрализованная барда. Работая с ненейтрализованной бардой, процесс протекал нормально до обмена 10%, при увеличении % обмена раствор скисал. Если раствор предварительно нейтрализовали гидратом окиси аммония, брожение протекало нормально при суточном обмене в 12,5%, причем количество витамина B_{12} превышало 2000 *мкг/л*. При добавлении к барде дрожжевого

автолизата в количестве 20% от общего сухого вещества в растворе, процесс брожения тормозился и в растворе накапливались летучие кислоты более 1 *г*/100 *мл*.

Это указывает на то, что при небольших количествах дрожжевой автолизат способствует процессу брожения и образование витамина B_{12} возрастает; а большие количества автолизата тормозят этот процесс.

Начаты опыты, в которых в качестве субстрата используется мицелий *Aspergillus niger*.

Ферментационный раствор составлен таким образом, что 70% сухого вещества составляет мицелий, а 30% спиртовая барда; к раствору добавлялся также нитрат кобальта. Получены следующие результаты:

% обмена свежей барды в сутки	Отношение объема выделившегося газа к количеству обмененной барды	Количество витамина B_{12} в *мгк*/*л*	Количество летучих кислот в *г*/100 *мл* в перерасчете на CH_3COOH
	18	1000	0,3
7,5	20—24	1200	0,4
10,0	20—24	1400	0,2—0,3
12,5	18—22	2000	0,3—0,4

Брожение протекает нормально, обменивая в сутки 12,5% свежего раствора, содержащего 5% сухого вещества. С этим сырьем опыты продолжаются.

ВЫВОДЫ

1. Спиртовую барду заводов Латв. ССР можно использовать как сырье для термофильного метанового брожения для получения биомассы, содержащей витамин B_{12}.

2. Для интенсификации процесса и увеличения выхода витамина B_{12} выгодно барду нейтрализовать гидратом окиси аммония.

3. Термофильное метановое брожение активизируется небольшой добавкой дрожжевого автолизата.

4. В качестве сырья для получения витамина B_{12} термофильным метановым брожением можно использовать и мицелий *Aspergillus niger*, который является отходом производства лимонной кислоты. Его можно использовать как в гомогенизированном, так и автолизованном виде.

ЛИТЕРАТУРА

1. Валдман А. Р. Витаминные ресурсы. Сб. 5. Изд-во АН СССР, 1961 г.

2. Букин В. Н., Михлин Э. Д., Быховский В. Я., Панцхава Е. С., Логоткин И. С. Витаминные ресурсы. Сб. 5. Изд-во АН СССР, 1961 г.

3. Постановление ЦК КПСС и Совета Министров СССР «О мерах по дальнейшему развитию биологической науки укреплению ее связи с практикой». «Правда», 29. I. 1963 г.

4. Barker H. A., J. Microbiol. Sercl., 6, 201 (1940).

5. Stadtman T. C., Barker H. A., J. Bacterial., 62, 269 (1951).

6. Barker H. A., Bacterial fermentations, 1956.

7. Friedrich V. F., Bernhauer K, Angev. Chemie 65, 627, 1953.

8. Быховский В. Я., Панцхава Е. С. Витаминные ресурсы, сб. 6.

9. Barker H. A., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 29, 184, 1943.

10. Klyyver A. J., Schnellen G. G., C. G. Arch. Biohem., 14, 57, 1947.

11. Панцхава Е. С. Витаминные ресурсы. Сб. 6. Изд-во АН СССР 1963 г.

12. Никитин Г. А. Украинский научно-исследовательский институт спиртовой промышленности, 1963 год.

13. Куцева Л. С. Витаминные ресурсы. Сб. 5. Изд-во АН СССР, 1961 г.

14. Чайковская С. М., Дружинина Е. Н. Микробиология, 26, 5, 609, 1957 г.

15. Иериусалимский Н. Д., Конова И. В., Неронова Н. М., Анчурова А. М. Витаминные ресурсы. Сб. 5. Изд-во АН СССР, 1961 г.

16. Stadtman T. C. Barker H. A., Arch. Biohem. 21, 256, 1949.

УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ ЛАТВИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА
им. П. СТУЧКИ, т. LXVII. 1965. ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И БИОХИМИЯ, № 11

Доц. канд. хим. наук
Э. ЦИЕЛЕНС

ДИНАМИКА ХОЛИНА В ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЕНАХ

СОДЕРЖАНИЕ ХОЛИНА В СЕМЕНАХ

Химический состав семян весьма разнообразен. Наряду с веществами, входящими в состав любой растительной клетки, мы находим в большом количестве запасные вещества: углеводы, липиды и, в меньшей мере, белки. У большинства семян главным запасным материалом являются липиды. Этим семена отличаются от всех остальных растительных тканей, где липиды встречаются обычно в ничтожных количествах.

В семенах злаковых растений основной запасной материал — углеводы, в соевых бобах — протеины. В семенах содержатся также самые различные продукты вторичного биосинтеза, из которых практически важны витамины.

Химический состав семян у растений различных систематических групп изучен весьма недостаточно; особенно мало данных о дикорастущих растениях. Они хранят много неисследованного материала для развития эволюционной биохимии растений.

Данные по химическому составу семян могут уточнить место растения в филогенетической системе.

Многолетние исследования А. Благовещенского на бобовых показали, что каждый вид этого семейства характеризуется определенным содержанием азота в семенах. Оказалось, что семена более примитивных форм содержат меньше азота, а в семенах растений, стоящих на более высокой ступени эволюции, содержание азота выше [1].

Такие данные очень важны для целенаправленной селекционной работы, где до последнего времени слишком мало внимания уделяли биохимическим показателям. Человек, вводя в культуру хлебные злаки, руководствовался главным образом величиной семян. Однако в семенах некоторых диких растений содержание белка больше, несмотря на меньшие размеры семян. Весьма вероятно, что это относится и

к другим химическим компонентам семян, в частности к витаминам.

С точки зрения физиологии питания холин считают витамином. Он необходим в корме домашнего скота и особенно птиц. Чтобы составить рациональные кормовые нормы, нужно знать природные источники холина и искать пути повышения его содержания в корме. Одна такая возможность заключается в проращивании семян. При прорастании семян содержание холина сначала понижается, а потом повышается. Его биологическая функция еще мало изучена, но, по-видимому, холин участвует во многих процессах обмена веществ.

На кафедре биохимии биологического факультета ЛГУ исследовалось содержание холина в семенах и его динамика при прорастании.

Общий холин определялся, осаждая его рейнекатом по методу Энгела. Результаты анализов обобщены в первой таблице.

Таблица 1

Содержание холина в семенах
(в *мг*/% холинхлорида на сухой остаток)

Виктория	*Victoria regia*	0
Водяная лилия	*Nymphea alba*	0
Сахарная свекла	*Beta vulgaris*	25
Дуб	*Quercus robur*	32
Айва японская	*Chaenomeles japonica*	45
Сосна Веймута	*Pinus strobus*	48
Пшеница	*Triticum vulgare*	48
Сосна	*Pinus silvestris*	50
Ель	*Picea exelsa*	51
Рожь	*Secale cereale*	54
Кукуруза	*Zea mays*	55
Помидор	*Solanum lycopersicum*	58
Морковь	*Daucus carota*	70
Огурец	*Cucumis sativus*	72
Ячмень	*Hordeum vulgare*	72
Пырей	*Agropyron imbricatum*	72
Овес	*Avena sativa*	86
Тимофеевка	*Phleum pratense*	96
Укроп	*Anethum graveolus*	107
Конский каштан	*Aesculus*	109
Клен	*Acer platanoides*	120
Бирючина	*Ligustrum vulgare*	124
Вишня	*Cerasus*	133
Яблоня ягодная	*Malus baccata*	135
Лен	*Linum usitatissium*	137
Лещина обыкн.	*Corylus avellana*	140
Ежа сборная	*Dactylis glomerata*	152
Яблоня 'Белый налив'	*Malus domestica*	157
Сирень венгерская	*Syringa Yosikaea*	159
Фасоль	*Phaseolus vulgaris*	160

Люцерна	*Medicago sativa*	165
Волоснец песчаный	*Elymus arenarius*	165
Слива домашняя	*Prunus domestica*	171
Аморфа	*Amorpha*	172
Горох	*Pisum sativum*	180
Бересклет европейский	*Evonymus europaea*	191
Бобы	*Vicia faba*	210
Липа обыкновенная	*Tilia cordata*	211
Тыква	*Cucurbita pepo*	223
Соя	*Soja hispida*	260
Салат	*Lactuca sativa*	277
Редис	*Raphanus sativus*	351
Горошек мохнатый	*Vicia villosa*	375
Рапс	*Brassica napus* (v. arv)	457
Клевер	*Trifolium pratense*	580

Данные первой таблицы показывают, что содержание холина подвержено большим колебаниям. Семена клевера содержат в 25 раз больше холина, чем семена сахарной свеклы. Наибольшее количество холина в тех семенах, где основными запасными материалами являются масла и белки, в семенах богатых углеводами холина меньше, а в семенах водяных растений его нет совсем. Сравнивая содержание белка и холина в семенах бобовых (2 табл.), видно, что имеется положительная корреляция между содержанием белка и холина.

Таблица 2

Сравнительное содержание холина и белков в бобовых

Leguminosae	Холин в *мг* %	Белки в % (1)
Phaseolus vulgaris	160	23
Medicago sativa	165	28,8
Pisum sativum	180	26,6
Vicia faba	190	24,2
Amorpha	172	29
Soja hispida	260	36
Vicia villosa	375	35,4
Trifolium	580	36

ДИНАМИКА ХОЛИНА В ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЕНАХ

В сухих семенах интенсивность обмена веществ очень низка, что проявляется в очень малой интенсивности дыхания. Обмен веществ значительно интенсифицируется при набухании и прорастании семян, что сопровождается различного рода изменениями в химическом составе семян. Распа-

даются запасные вещества семян, вещества из эндосперма транспортируются в ткани зародыша, начинается синтез новых веществ, из которых формируется молодой организм. В прорастающих семенах синтезируется холин [2]. Однако, систематических исследований о динамике холина в прорастающих семенах не имелось. Поэтому мы проследили за динамикой холина в различных семенах, изменяя в опытах некоторые факторы:

1) освещение,
2) доноров и рецепторов метильных групп,
3) ионизирующую радиацию.

Семена проращивались в темноте, при комнатной температуре, в сосудах на влажной фильтровальной бумаге. Результаты анализов помещены в 3-й таблице.

Таблица 3

Количество холина в прорастающих семенах в *мг*/% на сухой остаток

Семена	Дни при 24°						
	0	2	4	6	8	10	20
Сахарная свекла	28	33	38	34	18		
Пшеница	48	40	54	62	84	98	176
Сосна	48		31	58		66	76
Ель	51		33	59		85	104
Рожь	54	31	52	83	93	119	224
Кукуруза	55	51	92	167	169	173	
Морковь	70	63	53	137			
Ячмень	72	51	72	104	121	130	127
Огурцы	72	68	91	87	112	138	
Пырей	72	43	41	96	80		
Овес	74	62	102	112	110	128	124
Тимофеевка	96	45	55	64	82		
Укроп	107	61	84	170			
Лен	137	92	65	140	170	188	
Конопля	153	127	186	231	297	318	
Горох	165	157	151	208	183		
Бобы	210	264	362	308	192	113	
Тыква	223	125	163	191	247		
Салат	301	298	320	302			
Редис	351	437	475	408	215		
Клевер	530	339	414	432	547	364	
Рапс	557	548	580	632	742	612	

При ознакомлении с динамикой холина в прорастающих семенах бросается в глаза закономерное снижение содержания холина в первые дни прорастания, в последующие дни происходит интенсивный биосинтез холина, что приводит к тому, что на 4—10 день прорастания содержание холина выше исходного.

ДИНАМИКА ХОЛИНА В ЯЧМЕНЕ ПРОРАЩИВАЕМОМ В ЗАВОДСКИХ УСЛОВИЯХ

Некоторые продукты из проращенных семян имеют диетическую ценность. Их используют как сырье в пищевой промышленности (пиво, хлебопеченье, прохладительные напитки), так и непосредственно как диетические продукты. Таким продуктом является солод.

Ячмень проращивается для производства солода. Поэтому исследовались семена ячменя, которые проращивались на пивоваренном заводе на полу и в особых камерах. Проследили за динамикой холина в солоде во время технологического процесса. Результаты анализов помещены в таблицу 4.

Таблица 4

Количество холина в прорастающих семенах ячменя, проращиваемых на пивоваренном заводе на полу и в специальных камерах (в *мг*/%) на сухой вес.

1. Солодовый ячмень	72
Ячмень моченный 72 часа	50
Ячмень прор. на полу 24 часа	60
Ячмень прор. на полу 72 часа	121
Ячмень прор. на полу 144 часа	215
Солод сушенный в сушилке	183
Солод после месячного хранения	117
Солод после 3-месячного хранения	92
2. Солодовый ячмень моченный 48 часов	44
Ячмень прор. на полу 12 часов	49
Ячмень прор. на полу 60 часов	61
Ячмень прор. на полу 120 часов	136
Солод сушенный в сушилке	117
Солод после месячного хранения	86
Солод после трехмесячного хранения	76
Корешки солода	43
В проращиваемых камерах:	
Ячмень	72
Ячмень моченный 48 часов	66
Ячмень прор. 24 часа	93
Ячмень прор. 48 часов	104
Ячмень прор. 72 часа	113
Ячмень прор. 96 часов	129
Ячмень прор. 120 часов	151
Ячмень прор. 144 часа	218
Солод сушенный в сушилке	100
Корешки солода	198
Сушеный солод после 3-месячного хранения	78
В сухом остатке солодового экстр.	331
В сухом остатке напитка «Веселиба» (изготовл. из солодового экстракта)	176

Из данных 4 таблицы видно, что в ячмене при мочке до 72 часов количество холина резко уменьшается. Биосинтез холина начинается раньше у ячменя, проращенного в камерах, чем на полу. В камерах семена лучше аэрированы, чем на полу, что и является, очевидно, одним из факторов способствующим более быстрому биосинтезу холина. Как видно, в сушилке сушенный солод, как это имеет место в технологическом процессе часть холина теряется. Проросшие в сушилке семена сохнут 24 часа, и в это время температура постепенно повышается с 37° до 80°, и часть холина в это время распадается. Нужно уделить особое внимание режиму сушки того солода, который идет на изготовление солодового напитка, чтобы сохранить по возможности больше холина.

ВЛИЯНИЕ ФОТОСИНТЕЗА НА ДИНАМИКУ ХОЛИНА В ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЕНАХ

До сих пор мы рассматривали динамику холина в этиолированных проростках, в которых происходит типичный гетеротрофный обмен. Чтобы проследить за динамикой холина при переходе на автотрофный обмен, проростки семян выдерживали при дневном свете в лаборатории. Результаты анализов помещены в 5 таблицу.

Таблица 5

Количество холина в прорастающих семенах в *мг*/%

Семена	Этиолированные		На свету	
	10 дней	20 дней	10 дней	20 дней
Пшеница	98	176	127	136
Ячмень	130	127	152	113
Овес	127	126	171	162
Рожь	120	234	158	203
Лен	158	74	203	97
	102	73	114	125

Из 5 таблицы видно, что количества холина в этиолированных и освещенных семенах, в которых начался фотосинтез, не одинаковы. В проращенных на свету семенах после 10 дней большее содержание холина, чем в этиолированных, а после 20 дней у первых количество холина уменьшается или остается без изменения, за исключением семян ржи, где количество холина продолжает увеличиваться. В этиолированных семенах ржи и пшеницы после 20 дней количество

холина возросло вдвое, а в проращенных на свету только немного. Очевидно, имеется значительное различие в динамике холина в прорастающих семенах в периодах гетеротрофного и автотрофного обмена.

Определено и различие в обмене липидов. В семенах проращенных на свету все жиры распадаются с одинаковой скоростью, в темноте же быстрее всего исчезает линоленовая кислота. В проращенных на свету семенах пшеницы фосфатиды синтезируются непрерывно в течение первых 30 дней, а в темноте их количество увеличивается первые 10 дней, а затем уменьшается [14, 15].

ВЛИЯНИЕ ДОНОРОВ И АКЦЕПТОРОВ ЛАБИЛЬНЫХ МЕТИЛЬНЫХ ГРУПП

Последним этапом биосинтеза холина является реакция переметилирования, при которой лабильная метильная группа переносится на коламин. Холин в свою очередь сам может служить донором лабильной метильной группы.

В дальнейших опытах исследовалось влияние различных доноров и акцепторов метильных групп на динамику холина в прорастающих семенах. В качестве доноров лабильных метильных групп испытывались метионин, бетаин, диметилглицин и пангамовая кислота или витамин B_{15}. Акцепторами метильных групп — никотиновая кислота и никотинамид.

Семена смачивались 250 *мг*/% растворами упомянутых веществ и они оставались в сосудах все время проращивания. В одном опыте проверялся и холин, в какой степени он поглощается и накапливается семенами.

В 6 таблице помещены данные о семенах кукурузы, проращенных 5 дней, и семенах салата, проращенных 7 дней.

Таблица 6

Содержание холина в проростках кукурузы и салата

Добавка к воде	5-дневная кукуруза	7-дневный салат
1. Без добавки	130	278
2. Бетаин	149	296
3. Метионин	113	240
4. Никотиновая кислота	100	267
5. Никотинамид	102	
6. Холин	344	
7. Витамин B_{15}	127	
8. Диметилглицин	122	

Таблица 7

Количество холина в прорастающих семенах кукурузы

Добавка к воде	Дни				
	2	4	6	8	10
1. Без добавки	45	96	134	145	162
2. Диметилглицин	58	72	128	211	166
3. Витамин B_{15}	42	48	151	209	150
4. Никотиновая кислота	65	123	126	164	

Сравнивая данные 6и 7 таблицы, видно, что бетаин способствует накоплению холина как в семенах кукурузы, так и салата, метионин же задерживал накопление холина на 5 и 7 день проращивания. Диметилглицин и витамин B_{15} значительно увеличили накопление холина на 8 день в семенах кукурузы. Никотиновая кислота в этих опытах не дала однотипные результаты, и поэтому ее влияние исследовалось в следующей серии опытов вместе с облученными семенами. Семена поглощают холин из окружающей среды, и он накапливается в семенах кукурузы почти в трехкратных количествах.

ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ

Не выяснен вопрос о влиянии ионизирующей радиации на биосинтез холина и процессы переметилирования в прорастающих семенах. Поэтому мы исследовали динамику холина в процессе прорастания облученных семян, одновременно добавляя доноров и акцепторов метильных групп.

Облученные семена были получены от Института Биологии АН ЛССР. Они хранились несколько недель, а семена овса несколько месяцев. Доноры и акцепторы метильных групп добавлялись в такой же концентрации как в предыдущем опыте — 250 *мг*/%.

Полученные результаты помещены в таблицы 8—11.

Полученные в этом опыте данные не дают основания для определенного вывода. Отклонения под влиянием облучения наблюдались в ту и другую сторону контроля.

Хотя при отборе материала непроросшие и плохо прорастающие семена отбрасывались, очевидно, что не все семена прорастают одинаково интенсивно. Одним из факторов, обуславливающим неоднородность облученных семян, является относительно большое колебание в полученных тканевых до-

Таблица 8

Содержание холина в облученных прорастающих семенах

Образцы семян	Дни					
	0	2	4	6	8	10
Овес.						
1. Контроль	92	74	92	138	155	
2. Облученные γ лучами 5000 *р*	90	72	104	165	186	
3. Контроль	86	62	102	180	130	115
4. Облученные γ лучами 10 000 *р*	96	45	65	119	160	118
5. Контроль		63	110	132	147	
6. Облученные γ лучами 45 000 *р*		77	97	110	97	
7. Контроль + метионин		52	98	124	148	172
8. Обл. 5000 *р* + метионин		77	76	115	140	130
9. Контроль + бетаин		62	70	97	127	227
10. Обл. 5000 *р* + бетаин		45	56	79	115	194
11. Контроль + витамин PP		64	111	128	163	
12. Обл. 5000 *р* + витамин PP		83	103	146	206	
13. Ячмень Контроль	71	57	88	121	126	118
14. Облученные γ лучами 40 000 *р*	75	62	79	127	113	106

Таблица 9

Содержание холина в облученных прорастающих семенах сахарной свеклы в *мг*%

Образцы семян	Дни				
	0	2	4	6	8
1. Контроль	28	33	38	34	18
2. Контроль + вит. PP		24	27	37	20
3. Облученные γ лучами 6000 *р*	24	36	35	27	21
4. Обл. + вит. PP		30	33	43	24
5. Контроль	24	29	31	28	19
6. + диметилглицин		28	36	41	16
7. + витамин B_{15}		33	35	24	22
8. + витамин PP		22	47	44	28
9. Облученные γ лучами	27	22	33	31	29
10. Обл. + диметилглицин		18	33	48	26
11. Обл. + витамин B_{15}		36	29	39	20
12. Обл. + витамин PP		34	51	28	33

Таблица 10

Содержание холина в облученных прорастающих семенах гороха в *мг*%

Образцы семян	Дни					
	0	1	3	5	7	9
1. Контроль	151	145	127	159	183	127
2. Обл. γ лучами 5000 *р*	146	130	133	127	164	99
3. Обл. γ лучами 10 000 *р*	161	150	115	180	160	111

Таблица 11

Содержание холина в облученных прорастающих семенах маслянистых растений в *мг*%

Образцы семян	Дни							
	0	1	3	5	6	8	10	11
1. Лен контроль	139	91	57	115		269		188
2. Обл. γ лучами 50 000 *р*	134	104	67	90		170		241
3. Конопля контроль	153	127	142		154	194	211	
4. Обл. γ луч. 6000 *р*	141	131	187		231	297	318	
5. Рапс контроль	457		431		609	694	647	
6. Обл. 20 000 *р*	463		412		740	733	564	
7. Рипс контроль	455	352	314	352		368		416
8. Обл. γ лучами 50 000 *р*	445	285	383	353		319		343

зах (точность облучения ±20%), глубинная самоадсорбция ионизирующего облучения, а также различные сроки хранения облученных семян. Поэтому на сей раз нельзя точно объяснить каждую причину отклонений.

Общая картина такова, что в первые дни прорастания в облученных семенах уровень холина падает, а затем возрастает, так же, как это имеет место в необлученных семенах.

Наибольшее увеличение содержания холина по сравнению с контролем за все время прорастания наблюдалось у семян конопли, которые получили γ облучение 6000 *р*. В облученных семенах рапса количество холина достигало наивысшего уровня.

В семенах масличных растений, где наиболее высокий уровень холина, во время прорастания отмечались наибольшие колебания. Меньшие колебания уровня холина наблюдаются в необлученных и облученных семенах, где главными запасными веществами являются углеводы и белки.

АКТИВНОСТЬ ХОЛИНОКСИДАЗЫ В ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЕНАХ

Уровень холина в семенах является результатом двух противоположных процессов — биосинтеза и распада.

Прорастание семян начинается с распада холина. В нашей лаборатории мы проследили за активностью холиноксидазы.

За единицу относительной активности холиноксидазы мы приняли количество окисленного холина за 1 час при 37° прибавляя к 100 *мг*% раствору хлорида холина эмульсию из определенного числа семян в фосфатном буфере при pH—7,3. Активность рассчитывалась по формуле

$$Q = \frac{(a - б)\,100}{a},$$

где Q — относительная активность холиноксидазы,

a — количество холина до инкубации,

$б$ — количество холина после часовой инкубации.

Результаты анализов показаны на рисунках № 1 и № 2.

Кривые свидетельствуют о том, что в семенах после набухания имеется активная холиноксидаза, относительная активность которой во время прорастания постепенно уменьшается. Очевидно, холиноксидаза является фактором, разрушающим холин в первые часы прорастания семян. В эндосперме

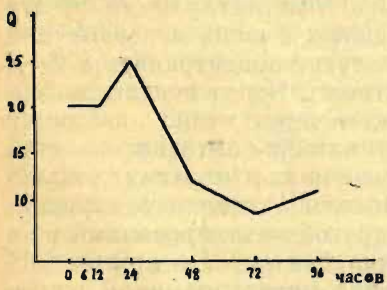


Рис. 1. Относительная активность холиноксидазы в прорастающих семенах конопли.

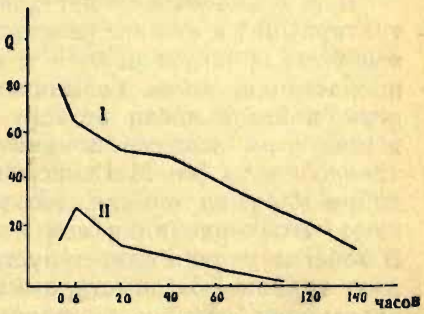


Рис. 2. Относительная активность холиноксидазы в эндосперме (I) и зародыше (II) семян кукурузы в процессе прорастания.

одного зерна кукурузы относительная активность холиноксидазы в несколько раз выше, чем в зародыше. В суспензии семян, проросших 4 дня, относительная активность холиноксидазы практически равна 0. На этом этапе прорастания, очевидно, начинают преобладать процессы биосинтеза холина.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При прорастании семян самых различных видов растений наблюдается общее явление: в начале прорастания в первые 2 дня уровень холина понижается, а в последующие дни опять повышается. В семенах сахарной свеклы, однако, динамика холина в процессе прорастания семян иная: содержание холина не понижается на второй день прорастания, а несколько возрастает. Зато в семенах сахарной свеклы очень высокая концентрация бетаина — 690 *мг*%, которая на четвертый день прорастания падает до 200 *мг*% [3]. Как видно, в семенах сахарной свеклы очень интенсивно потребляется бетаин, который, предположительно, в этих семенах замещает холин.

Бетаин является метаболитом холина, который образуется при окислении холина холиноксидазой. При деметилировании бетаина освобождаются лабильные метильные группы, которые могут участвовать в процессах переметилирования. В последнее время появляются данные, доказывающие, что во время прорастания в семенах образуются различные вещества, содержащие метильные группы.

В семенах ячменя нет алкалоида хорденина (*N, N*-диметилтирамин) и его предшественника *N*-метилтирамина, но эти вещества обнаруживаются в корешках ячменя в первые дни прорастания, достигая максимальную концентрацию с 3—9 день, в зависимости от сорта ячменя. Через неделю содержание этих веществ понижается и через месяц остаются только следы [4]. Метилфераза тирамина активна во всей длине корешка ячменя. Исследования с изотопами доказывают, что хорденин и его метаболиты остаются в корешке. В побегах ячменя синтезируется другой метилированный продукт гранин 1-3-(диметиламиноэтил) индол. И в других прорастающих семенах синтезируется *N*-метилтирамин и хорденин [5]. В проращенных семенах ячменя обнаруживается 3-аминометилиндол [6]. В побегах молодого ракитника (*Cytisus laburnum*) цитизин метилируется в *N*-метилцитизин [7]. В литературе имеются противоречивые данные о метилирова-

нии никотинамида в молодых проростках. Стулникова [8] сообщает, что в проростках бобов, пшеницы, кукурузы синтезируется *N'*-метилникотинамид (*N'*-МНА). Однако Йоши и Хандлер этого не подтверждают [9]. Мы также в проростках ячменя и кукурузы не могли обнаружить *N'*-МНА.

В проростках пшеницы очень быстро синтезируется аллантоин и алантоиновая кислота [10]. Думается, что эти вещества синтезируются из глицина, образуя в качестве промежуточного продукта пурин. Глицин в свою очередь может образоваться при деметилировании бетаина, как это доказано в тканях животных. Интересно отметить, что в проростках пшеницы синтезируется и креатин, который долго рассматривали как исключительно животный продукт, для синтеза которого необходимы как лабильные метильные группы, так и глицин.

Таким образом, можно сказать, что для начальных стадий прорастания семян характерно образование различных метилированных продуктов, однако об их физиологической функции еще очень мало что известно.

Некоторые исследователи обнаружили в высших растениях холинфосфат, который участвует в транспорте фосфора [11]. В проростках кукурузы, ячменя и подсолнуха обнаружен сульфат холина, который предположительно является запасной формой сульфата [12]. В общем в семенах, богатых липидами, высокий уровень холина. Наивысший уровень холина 557 *мг*% в семенах масличного растения рапса, в котором содержится 46% масла. При прорастании таких семян липиды подвергаются интенсивному метаболизму. Жирные кислоты распадаются β-окислением. Из молекул ацетильного производного КоА и глиоксалата, который образуется из изолимонной кислоты через глиоксалевый цикл, синтезируется малоновая кислота, из которой могут образоваться углеводы.

Жирные кислоты могут распадаться и α-окислением. Разлагаясь по этому пути, жирные кислоты сначала декарбоксилируются. При гидролизе жиров образуется глицерин, о судьбе которого в обмене семян нет точных исследований. Полагают, что он включается в общий обмен углеводов. При прорастании семян пшеницы в первые дни уменьшается количество жиров, а в последующие дни опять ресинтезируется. Подобная динамика наблюдается и у холина в семенах пшеницы. Возможно, что и в растениях холин участвует в обмене липидов, как это имеет место в организме животных.

Участие холина в обмене прорастающих семян весьма многостороннее. Он участвует в синтезе фосфатидов как интактная молекула, в транспорте сульфата и фосфата. Структур-

ные компоненты холина — лабильные метильные группы и углеродный скелет используются как исходный материал для различных процессов биосинтеза. Один из путей катаболизма холина, осуществляемый холиноксидазой, приводит к образованию бетаина. Возможно, что существуют и другие пути катаболизма.

Так как катаболизм холина в первой фазе прорастания, очевидно, универсальное явление, то можно предположить, что это филогенетически очень древняя реакция. В начальной фазе прорастания протекает типично гетеротрофный обмен веществ. В этом отношении онтогенез автотрофных организмов начинается подобно тому, как начинается обмен веществ первобытных биологических систем: использованием готовых молекул органических веществ. Конечно, обмен веществ при прорастании семян процесс более высоко организованный, возникший в результате длительной эволюции. Его регулирует генетическая информация и запасные вещества, накопленные в семенах. Последние, в свою очередь, накапливаются не случайно, а их определяет особая биология вида. Все-таки и в высоко организованном процессе обмена сохраняются первоначальные реакции, которые появились еще в анаэробной стадии развития жизни, что доказывает также гликолиз в обмене углеводов. Возможно, что и катаболизм холина в начале прорастания семян отражает первоначальную реакцию, появившуюся при гетеротрофном обмене.

ВЫВОДЫ

1. Содержание холина в семенах весьма различно. Наибольшее количество холина в тех семенах, где основными запасными материалами являются масла и белки; в семенах богатых углеводами холина мало, а в семенах водяных растений его нет совсем.

2. В семенах бобовых, где выше % белка, в общем и большее содержание холина.

3. Уровень холина в первые дни прорастания семян падает. Универсальность этого явления позволяет высказать гипотезу, что катаболизм холина в начальной фазе прорастания филогенетически очень древняя реакция, которая появилась в первичном гетеротрофном этапе обмена веществ.

4. Активность холиноксидазы, весьма высокая в первые дни прорастания семян, уменьшается в дальнейшем. Относительная активность холиноксидазы в эндосперме семян кукурузы во много раз выше, чем в зародыше.

5. Предположительно, что в первые дни прорастания холин является источником лабильных метильных групп и глицина для различных процессов биосинтеза и переметилирования.

6. В дальнейшем при прорастании семян количество холина значительно возрастает. Таким образом путем проращивания можно повысить количество холина в корме.

7. В облученных семенах, у которых прорастание не было задержано, динамика холина в общем сходна с контролем. Наибольшие колебания холина наблюдаются в семенах масличных растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. В. Благовещенский, Е. Г. Александрова. Эволюционная биохимия. М., 1964.
2. E. Cielēns, Latvijas PSR ZA Vēstis 9, 53, 1949.
3. A. Simenauer, Bull. Soc. Chim. biol. 40, Nr. 1, 203, 1958.
4. I. D. Mann, C. E. Steinhart, S. H. Mudd, J. Biol. Chem. 238, 676, 1963.
5. S. H. Mudd, Biochimica et biophysica acta 37, 164, 1960.
6. S. H. Mudd, Nature 189, 489, 1961.
7. M. Pōhm, Monatsch. Chem. 90, 58, 1959.
8. Р. И. Ттульникова, Научные записки Черниветск. унив., 1956.
9. G. Joshi, Ph. Handler, J. Biol. Chem. 235, 237, 1960.
10. R. M. Krupka, G. H. Towers, Canad. J. Bot., 37, 539, 1953.
11. V. Maizel, A. Benson, N. Tolbert, Plant Physiol. 31, 407, 1956.
12. Per Nissen, A. A. Benson, Science, 134, 1759, 1961.
13. L. E. Yocum, J. Agron. Res., 34, 727, 1925. o.
14. Hardman E. E., Crombie W. M., J. Exp. Bot. 9, 239, 1958.
15. Boatman S. G., Crombie W. M., J. Exp. Bot. 9, 52, 1958.
16. H. J. Lee, S. J. Kim, Arch. Bioch a Bioph. 107, 479, 1964.
17. A. Oaks, H. Beevers, Plant Physiol. 39, 431, 1964.
18. E. A. Cossins, S. K. Sinha, Bioch, Bioph. Acta, 90, 173, 1964.

E. CIELENS.

THE DYNAMICS OF CHOLINE IN THE GERMINATING SEEDS.

SUMMARY

The contents of choline in the seeds is very different. The biggest amount of choline is in those seeds, where the reserve materials are oils and proteins. In the seeds, which are rich in hydrocarbons the amount of choline is small, but in the seeds of water plants there is no choline at all.

The level of choline in the first days of seed germination falls. The universal features of the process affords to conclude that the catabolism of choline in the initial phase of germination is a very old pathway of metabolism, which is supposed to have arisen at the initial stage of metabolism at all. In the first days of germination of the seeds the intensity of cholineoxydase is the highest, but it decreases later on. It is supposed that during the first days of germination the choline is the sourse of methyl groups for different transmethylations.

УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ ЛАТВИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА
им. П. СТУЧКИ. т. LXVII. 1965. ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И БИОХИМИЯ. № 12

Э. ЛАНГЕ, Л. ВАНАГ

ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ ДОЗ МИКРОЭЛЕМЕНТА МЕДИ НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У КУР

Рост и развитие птиц по данным ряда исследователей (Берзинь Я. М., 1956; Узилевская П. Ш., 1959; Hill Ch. H., Matrone G., 1961 и др.) увеличиваются как при добавке смеси микроэлементов к корму, так и при внесении отдельных микроэлементов. Особенно важную роль играют соли микроэлемента меди.

Физиологическая роль меди у разных животных широко изучена. Обнаружена ее способность изменять опсонофагоцитарные реакции. Так влияние микроэлемента меди на фагоцитоз лейкоцитов изучалось при добавлении растворов солей меди к крови человека (Гончарова Н. В., 1950) и лягушек (Черкасова Е. В., 1955) in vitro. Опыты проводились также путем введения микроэлемента меди в организм животного (Гараиев А. И., Чебиева С. Э., 1960).

Нам неизвестны работы о влиянии меди на фагоцитоз лейкоцитов у птиц, в том числе у кур.

Изучение фагоцитоза лейкоцитов кур при введении в организм неспецифических средств, повышающих его резистентность, имеет не только теоретическое, но и практическое значение, напр., в борьбе с туберкулезом, тифом и др. болезнями птиц.

В нашей республике туберкулез птиц, особенно кур встречается часто (Saulīte E., 1956; Bitēna A., 1961).

Мы изучали влияние разных доз меди на фагоцитарные показатели, морфологическую картину и количество гемоглобина крови кур. Наряду с исследованиями о влиянии меди на общие фагоцитарные показатели лейкоцитов, изучались формы лейкоцитов, принимающие участие в фагоцитозе и изменение фагоцитарных свойств лейкоцитов.

Опыты проводились на 3 группах неполовозрелых кур в возрасте от 4 до 7 месяцев. Группы по своему составу были равноценными. Одна группа служила контролем, двум

подопытным группам перорально вводили микродобавки солей меди. Куры первой подопытной группы получали 0,005 *мг* меди на 1 *кг* веса тела, а куры второй группы — 0,5 *мг/кг* меди.

Опыты проводились в двух сериях. В первой серии растворы соли меди вводились курам однократно, а во второй серии — многократно в течение 10 дней. Обе серии опытов проводились на тех же птицах с интервалом в 6—8 недель.

Кровь для анализа бралась из подкрыльцевой вены (*v. cutanea ulnaris*) перед введением меди и на 2-й, 10-й и 20-й день после прекращения введения меди. Кровь у кур контрольной группы бралась в те же дни.

Количество эритроцитов подсчитывалось в камере Горяева, лейкоциты окрашивались витально (Пучков Н. В., 1962). Количество гемоглобина определялось по Сали. Для определения лейкоцитарной формулы мазок окрашивался по Гимза-Романовскому. Количество лимфоцитов и псевдоэозинофилов в 1 *мм*^{3} крови выражено в абсолютных цифрах.

Фагоцитоз лейкоцитов определялся по методу Пучкова Н. В. и Титовой С. М. (1950) и выражался фагоцитарной интенсивностью (по количеству поглощенных частиц в 100 лейкоцитах) и фагоцитарной активностью (в процентах число фагоцитирующих лейкоцитов). Нами подсчитана также абсолютная фагоцитарная интенсивность псевдоэозинофилов.

Полученные результаты подвергнуты статистической обработке (Беленький М. Л., 1959).

Средний морфологический состав периферической крови у всех животных перед опытом представлен в табл. 1.

Таблица 1

Показатели периферической крови у кур в начале опыта

Показатели	Предельные колебания	Среднее число
Эритроциты в *мм*^{3} (в млн.)	2,02—3,91	3,258
Гемоглобин (в %, по Сали)	52—69	64
Лейкоциты в *мм*^{3} (в тысячах)	12—32	24,7
Лейкоцитарная формула (в %)		
псевдоэозинофилы	24—52	42
лимфоциты	47—65	52
моноциты	0—11	3
эозинофилы	0—5	5
базофилы	0—4	1,4

Наши результаты, свидетельствующие о больших индивидуальных колебаниях всех морфологических показателей крови кур, согласуются с литературными данными (Ионов П. С., Мухин В. Г., Федотов А. И., Шарабрина И. Г., 1952; Shermer S., 1958).

При добавочном введении меди в организм кур увеличивается количество эритроцитов и гемоглобина (рис. 1). Уже на второй день после прекращения однократного и повторного введения меди заметно небольшое понижение количества эритроцитов. Результаты статистически достоверны. В большинстве случаев уменьшается и количество гемоглобина. Затем наблюдается постепенный медленный прирост количества эритроцитов и гемоглобина и через 40 дней после окончания 2-й серии опытов у подопытных групп эти показатели превосходят первоначальный уровень — количество эритроцитов увеличивается даже на 31,6%. Очень резкое

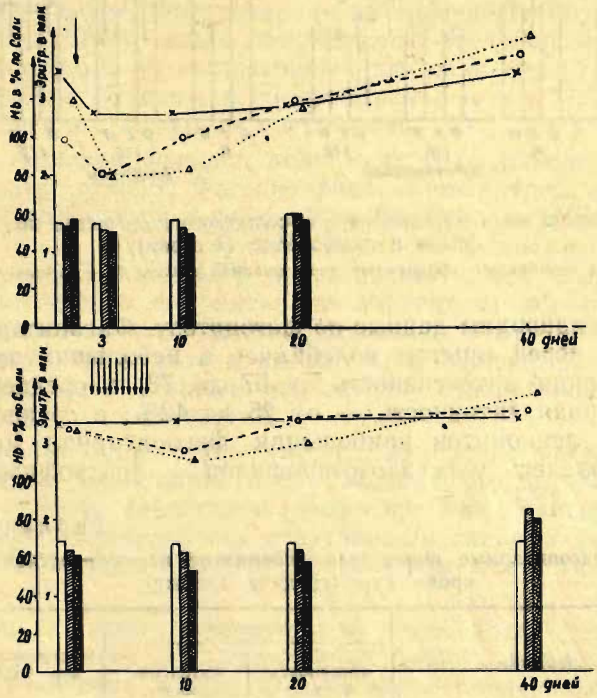


Рис. 1. Влияние меди на изменение количества эритроцитов и гемоглобина крови кур (среднее число).

Обозначения: стрелка — введение меди, светлые столбики — количество гемоглобина в крови контрольной группы, параллельно заштрихованные — I гр., перекрестно заштрихованные — II гр., кривые — среднее количество эритроцитов (непрерывная — контр. гр., прерывистая — I гр., пунктированная — II гр.)

увеличение гемоглобина на 34,0% наблюдается после повторного десятидневного введения меди.

У контрольной группы количество эритроцитов и гемоглобина в течение опытного периода не увеличивалось.

Общее количество лейкоцитов и количество лимфоцитов при введении меди не обнаруживают существенных изменений. Однако количество псевдоэозинофилов увеличилось на второй день после однократного введения меди. Это увеличение статистически достоверно (рис. 2).

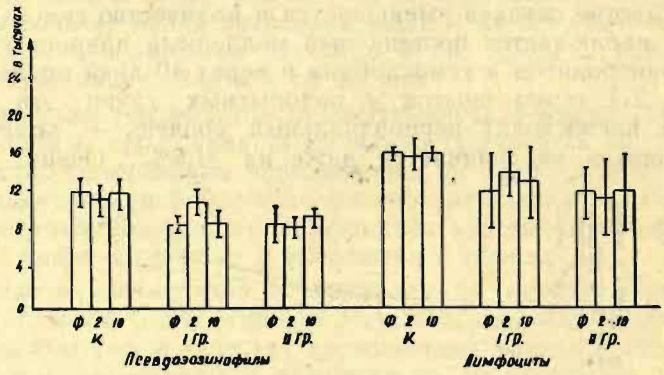


Рис. 2. Влияние меди на изменение абсолютного количества псевдоэозинофилов и лимфоцитов (I серия).

Цифры под столбиками обозначают день анализа крови, Ф — в начале опыта.

Далее приводим данные по фагоцитозу. Фагоцитарные показатели перед опытом колебались в небольших пределах: фагоцитарная интенсивность от 57 до 73, в среднем 66, а фагоцитарная активность — от 25 до 42%, в среднем 36%.

Среди лейкоцитов наибольшая фагоцитарная интенсивность оказалась у псевдоэозинофилов — нейтрофилов (таблица 2).

Таблица 2

Фагоцитарные показатели лейкоцитов периферической крови кур (средние данные)

Лейкоциты	Фагоцитарная		Фагоцитарное число
	активность в %	интенсивность	
Псевдоэозинофилы	31±8,0	59±12	1,90
Эозинофилы	2,0±0,4	3±1,0	1,66
Лимфоциты	3,5±0,6	4±1,0	1,14
Моноциты	3,0±1,0	6±0,0	2,18

Их фагоцитарная интенсивность составляет в среднем 89,3%, а фагоцитарная активность — 86,1% от общих фагоцитарных показателей. Небольшой фагоцитарной способностью обладают также моноциты, лимфоциты и эозинофилы кур. Фагоцитоза у базофилов нам не удалось наблюдать. Интересно отметить высокое фагоцитарное число моноцитов, хотя другие фагоцитарные показатели у них слабо выражены.

Введение меди существенно изменяет фагоцитарные способности лейкоцитов. Изменение общих фагоцитарных показателей лейкоцитов и их индивидуальные колебания приведены на рис. 3.

На второй день после прекращения введения малой дозы меди общая фагоцитарная интенсивность и активность лейкоцитов увеличивается у всех подопытных животных в I и II сериях опытов. Фагоцитарная интенсивность возрастает в среднем на 61,0% после однократного введения меди (I серия) и на 54,5% после повторного введения меди (II серия), фагоцитарная активность соответственно — на 21,0 и 25,2% по сравнению с исходным состоянием.

При введении большой дозы меди мы наблюдали противоположный эффект. Фагоцитарная интенсивность в I серии опытов уменьшается в среднем на 61,1% и во II серии опытов на 48,4%. Фагоцитарная активность соответственно снижается на 47,3 и на 44,2% по сравнению с исходным состоянием. Постепенно фагоцитарные показатели нормализуются и возвращаются к исходному состоянию. Статистическая достоверность представлена на рис. 4. В отличие от подопытных групп фагоцитарные показатели контрольной группы существенно не изменяются.

Из наших опытов вытекает, что изменение фагоцитарных показателей лейкоцитов после введения меди является, в первую очередь, следствием увеличения или уменьшения фагоцитарной интенсивности и активности главных фагоцитов-псевдоэозинофилов (рис. 5). Результаты статистически достоверны.

Таким образом фагоцитарная способность лейкоцитов крови кур зависит от фагоцитарных свойств псевдоэозинофилов. Соотношение между абсолютным количеством псевдоэозинофилов и их фагоцитарными свойствами показано на рис. 6.

В контрольной группе фагоцитарные показатели колеблются в небольших пределах, но в подопытных группах они резко отклоняются от исходного состояния.

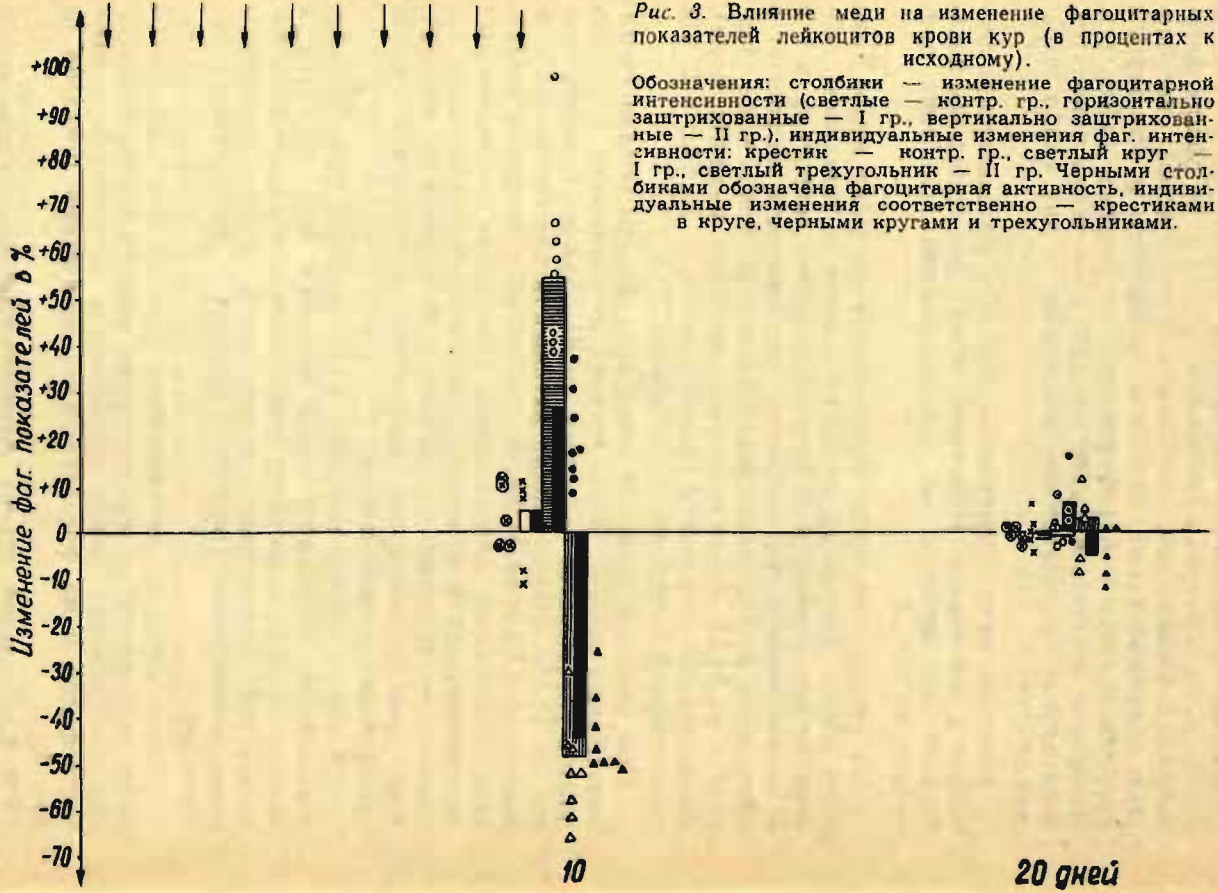


Рис. 3. Влияние меди на изменение фагоцитарных показателей лейкоцитов крови кур (в процентах к исходному).

Обозначения: столбики — изменение фагоцитарной интенсивности (светлые — контр. гр., горизонтально заштрихованные — I гр., вертикально заштрихованные — II гр.), индивидуальные изменения фаг. интенсивности: крестик — контр. гр., светлый круг — I гр., светлый трехугольник — II гр. Черными столбиками обозначена фагоцитарная активность, индивидуальные изменения соответственно — крестиками в круге, черными кругами и трехугольниками.

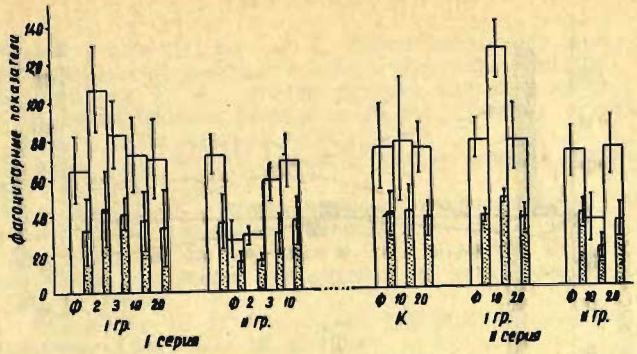


Рис. 4. Изменение фагоцитарных показателей лейкоцитов крови кур у контрольной и подопытных групп в зависимости от количества введенной меди.

Обозначения: светлые столбики — фаг. интенсивность, пунктированные — фаг. активность. Остальные обозначения те же, что на рис. 2.

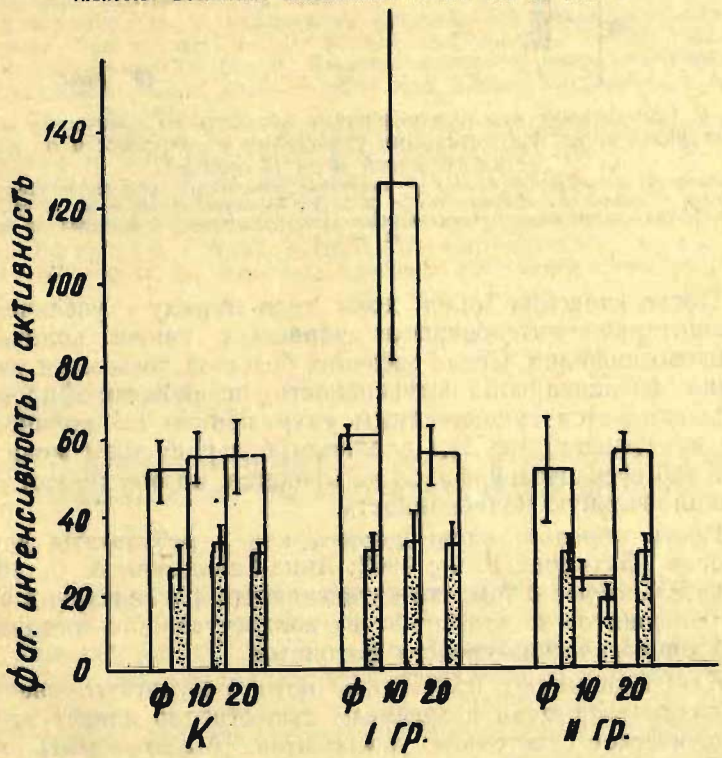


Рис. 5. Влияние меди на изменения фагоцитарных показателей псевдоэозинофилов у всех групп (II серия).

Обозначения те же, что на рис. 4.

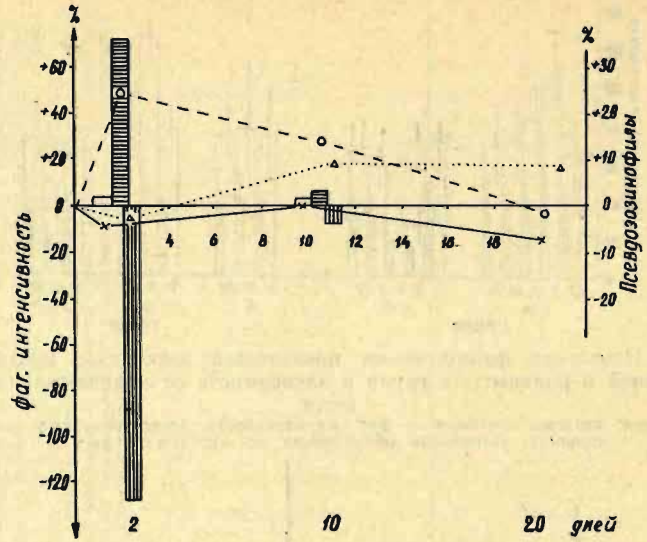


Рис. 6. Соотношение между изменениями абсолютного количества псевдоэозинофилов и их фагоцитарными свойствами в зависимости от количества введенной меди (I серия).

Обозначения: непрерывная кривая — изменение абсолютного количества псевдоэозинофилов в контр. гр., прерывистая — в I гр., пунктированная — во II гр., столбики — фаг. интенсивность псевдоэозинофилов. Остальные обозначения те же, что на рис. 3.

После введения малой дозы меди наряду с увеличением фагоцитарной интенсивности нарастает также количество псевдоэозинфилов. После введения большой дозы меди уменьшение фагоцитарной интенсивности псевдоэозинофилов не сопровождается существенным уменьшением их количества. Это показывает, что под влиянием большой дозы меди, количество псевдоэозинофилов не меняется, но они теряют свою функциональную полноценность.

Таким образом, наши данные, как и результаты других авторов (Батирова Г. Ф., 1962; Анна-Гельдыева А. Г., 1963), свидетельствуют о том, что интенсивность фагоцитарной реакции лейкоцитов не зависит от их количественного состава, но от физиологических свойств фагоцитов.

Как показывают полученные нами результаты, введение микроэлемента меди в организм существенно влияет на физиологическое состояние лейкоцитов. Малые дозы меди 0,005 *мг/кг* стимулируют фагоцитарные свойства лейкоцитов кур, т. е. псевдоэозинофилов, а большие дозы — 0,5 *мг/кг* снижают их фагоцитарную интенсивность и активность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анна-Гельдыева А. Г. Нейрогуморальная регуляция фагоцитарной активности лейкоцитов крови, автореф., Ашхабад, 1963.

2. Батирова Г. Ф. Влияние раздражения механорецепторов желудка и некоторых отделов кишечника на фагоцитарную активность лейкоцитов крови у собак, автореф., 1962.

3. Беленький М. Л. Элементы количественного фармакологического эффекта, Рига, 1959.

4. Берзинь Я. М. Применение солей микроэлементов в кормлении сельскохозяйственных животных. Микроэлем. в с/х и мед., Рига, 1956.

5. Гараиев А. И., Чебиева С. Э. Влияние меди и марганца на фагоцитарную активность лейкоцитов. Тр. сект. физиол. АН Азерб. ССР, 3, 35—92, 1960.

6. Гончарова Н. В. О влиянии сернокислой меди на опсонический показатель. Клин. мед., 28, 2, 1950.

7. Ионов П. С., Мухин В. Г., Федотов А. И., Шафабрик И. П. Лабораторные исследования в ветеринарной клинической диагностике, 1952.

8. Пучков Н. В. Белые кровяные тельца. Рук. по мет. исслед. физиол. рыб, Москва, 16—18, 1962.

9. Пучков Н. В. Определение фагоцитарной способности лейкоцитов крови. Рук. по мет. исслед. физиол. рыб, Москва, 24—30, 1962.

10. Узилевская П. Ш. Влияние подкормок микроэлементами на продуктивность сельскохозяйственных птиц. Прим. микроэлем. в с/х и мед., Рига, 543—546, 1959.

11. Черкасова Е. В. Влияние меди на фагоцитарную активность лейкоцитов лягушки. Тр. Туркм. мед. ин-та, 6, 292, 1955.

12. Bitēna A., Putnu tuberkuloze un tās apkarošana, 1961.

13. Saulīte E., Putnu tuberkuloze un tās apakarošana, 1956.

14. Hill Ch. H., Matrone G., Studies on copper and iron deficiencies in growing chickens, J. Nutr., 73, Nr. 4, 425—431, 1961.

15. Shermer S., Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere, 1958.

E. LANGE and L. VANAG

THE INFLUENCE OF DIFFERENT DOSES OF COPPER ON SOME INDICATORS OF THE PERIPHERAL BLOOD OF HENS

SUMMARY

Employing 0,05 and 0,5 mg copper in the ration of hens on 1 kg of the body weight once and then again repeatedly for ten days, we observe the increase of the number of erytrocytes and of the amount of haemoglobin as well as the changes in phagocytosis of leucocytes. The smaller dose of copper (0.05 mg/kg) used in our experiments increases the phagocytic intensity and activity of leucocytes in comparision with the initial state, whereas the bigger dose of copper (0,5 mg/kg) decreases phagocytosis.

The greatest capacity of leucocytes in the blood of hens are pseudoeosinophiles.

It was stated that the phagocytic intensity and activity was not dependent on the amount of pseudoeosinophiles in the peripheral blood. Copper after it has been introduced in the blood of hens, changes the physiological propertees of leucocytes.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Сдано в набор 2 января 1965 г. Подписано к печати 21 апреля 1965 г. Формат бумаги 60×90/16, 9,25 физ. л., 9,25 уч. л., 8,21 изд. л. Тираж 700 экз. ЯТ 06130. Цена 68 коп.

Издательство «Звайгзне», г. Рига, ул. Пилс, 23. Отпечатано в типографии № 1 «Циня» Управления полиграфической промышленности Государственного комитета Совета Министров Латвийской ССР по печати, г. Рига, ул. Блаумана, 38/40. Заказ 121.

68 коп.