НЕКОТОРЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ АПРОБАЦИИ СРЕДСТВА «АЛЬДОФИКС» ПРИ ФИКСАЦИИ ИХТИОПЛАНКТОНА НА ПРИМЕРЕ ИКРЫ МИНТАЯ *THERAGRA CHALCOGRAMMA* (PALLAS)

Д.Я. Саушкина, А.В. Виноградская

Ст. спец.; спец.; Камчатский филиал Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии («КамчатНИРО»)
683000 Петропавловск-Камчатский, Набережная, 18
Тел.: 8 (4152) 41-27-01. E-mail: melnik.d.y@kamniro.ru

ИХТИОПЛАНКТОН, ИКРА МИНТАЯ, ФИКСАЦИЯ, АЛЬДОФИКС, ФОРМАЛИН

Приводятся данные о новом средстве для фиксации ихтиопланктона — «Альдофикс». Проведены серии экспериментов по консервации икры минтая в оригинальном средстве «Альдофикс», а также в его усовершенствованных растворах. Описывается внешний вид и цвет икринок минтая, а также рассмотрено изменение их диаметра после фиксации в формалине и «Альдофиксе». Сделан вывод, что для фиксации ихтиопланктона наиболее подходящим фиксирующим раствором является «Альдофикс» (образец № 1).

SOME OF TEST RESULTS OF THE “ALDOFIX” IN FIXING THE PHYTOPLANKTON ON THE EXAMPLE OF EGGS OF WALLEYE POLLOCK *THERAGRA CHALCOGRAMMA*

Darya Ya. Saushkina, Anastasia V. Vinogradskaya

Senior Specialist; Specialist; Kamchatka Branch of Russian Research Institute of Fisheries and Oceanography (“KamchatNIRO”)
683000 Petropavlovsk-Kamchatsky, Naberezhnaya, 18
Tel.: +7 (4152) 41-27-01. E-mail: melnik.d.y@kamniro.ru

ICHTHYOPLANKTON, WALLEYE POLLOCK EGGS, FIXING, ALDOFIX, FORMALIN

Data about new conservant “Aldofix” to fix ichthyoplankton are demonstrated. Series of experiments on the conservation of ichthyoplankton and eggs of walleye pollock were carried out with the use of “Aldofix” and its modernized solutions. External view, including color of the eggs, as a result of fixing in different solutions was described, and difference in the egg diameter was noted in case of fixing in formalin and “Aldofix”. It is concluded, that “Aldofix” (example № 1) was the most convenient fixing solution to preserve ichthyoplankton.

Для сохранения и транспортировки отобранного в полевых условиях биологического материала, в том числе и ихтиопланктонных проб, применяют различные консерванты (альдегиды, кислоты, спирты и др.). В основном, для этих целей используют формалин различной концентрации (Горбунова, 1952; Перцева-Остроумова, 1961; Коржевский, 2013).

Формальдегид — это бесцветный газ с резким запахом, легко растворимый в воде и спирте. Концентрация насыщенного раствора в воде составляет 40% (по объему) или 37% (по массе). Растворенный в воде формальдегид называют формалином (Григорьев, Коржевский, 2018). Формалин находит применение в таких сферах, как: производство кожи, бумаги, синтетических смол, пластмасс, пестицидов, бальзамических средств, используется в сельском хозяйстве и медицине, в т. ч. и в ихтиологических исследованиях. Этому веществу присвоен II класс опасности: высокоопасные вещества. При контакте с формалином заметных негативных воздействий на человеческий орга-

низм достаточно много. Например, пары яда оказывают влияние на глаза, дыхательные пути, кожные покровы, репродуктивные органы, также имеются сведения о канцерогенных свойствах формалина (СанПиН 1.2.2353-08. Канцерогенные факторы и основные требования к профилактике канцерогенной опасности) (Иптышев, Доморацкая, 2017). Вышеупомянутые факты дают существенный повод для поиска альтернативных средств фиксации биологического материала, в частности для проб ихтиопланктона.

Так как формалин является крайне опасным раствором, компания ООО «Новохим», занимающаяся разработкой и производством малотоннажной химии, изготовила альтернативный альдегидный фиксатор «Альдофикс» на основе глиоксаля — вещества высокой чистоты, обладающего широким спектром действия и низким уровнем токсичности для человека. Согласно разработанной ими инструкции по применению данного средства, ему присвоен IV класс опасности: малоопасные вещества. Он пред-

ставляет собой бесцветную жидкость без запаха, а также практически не оказывает раздражающего действия на кожу и слизистые оболочки.

Эффективность средства «Альдофикс» исследовали в некоторых сельскохозяйственных и медицинских вузах России (Ивановская государственная сельскохозяйственная академия им. Д.К. Беляева; Кемеровский государственный медицинский университет; Тверской государственный медицинский университет; Сибирский государственный медицинский университет; Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова) при фиксации различного биологического материала. По результатам ряда проведенных экспериментов установлено, что зафиксированные препараты сохраняют свою структуру, отсутствует помутнение раствора, а также запах. Важную роль играет факт крайне низкой токсичности средства, что облегчает его применение и делает более привлекательным из-за отсутствия опасений за здоровье использующих его людей (Иптышев, Доморацкая, 2017).

Фиксирующие свойства большинства растворов основаны на замещении воды в составе тканей их компонентами. Так как гидробионты могут содержать до 80% воды, то ее замещение сказывается на изменении массы объекта и его внешнего вида (Новосадова, Новосадов, 2015). Ихтиопланктонные пробы чаще всего фиксируют формалином. Проведенные ранее исследования о влиянии консервации формалином на величину икринок минтая *Theragra chalcogramma* показали, что при длительной фиксации размеры икринок уменьшаются, а также изменяются размер желтка и целостность пигментных клеток (Горбунова, 1952).

В качестве эксперимента в 2018–2019 гг. на базе Камчатского филиала ФГБНУ «ВНИРО» («КамчатНИРО») при фиксации проб ихтиопланктона наряду с формалином был использован альтернативный фиксатор — «Альдофикс».

Целью исследований явилось установление возможности использования «Альдофикса» в качестве альтернативного фиксирующего средства.

Задачи: выяснить влияние фиксации формалином и «Альдофиксом» на величину икринок минтая; оценить внешний вид и качество икры минтая после фиксации различными средствами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для исследований послужили пробы ихтиопланктона, собранные сотрудниками лаборатории морских рыб Камчатского филиала ФГБНУ «ВНИРО» («КамчатНИРО») во время выполнения весенних ихтиопланктонных съемок у берегов Восточной Камчатки в марте–апреле 2018–2019 гг. Для выяснения влияния фиксации 4%-м формалином и оригинальным средством «Альдофикс» использована пелагическая развивающаяся икра минтая.

При проведении первого эксперимента (22 марта 2018 г.) из общей пробы взяли выборку в количестве 50 экз. живой икры минтая на I стадии развития, икра была измерена. Из этой же общей пробы были взяты еще 200 икринок, половину из которых зафиксировали 4%-м формалином, другую половину — средством «Альдофикс» (таблица 1). Через 18 мес. провели их измерения. Для получения более полного представления о происходящих изменениях размера икры в данных фиксирующих растворах использовали большее ее количество. По литературным данным (Горбунова, 1952), при хранении икры минтая в 2%-м формалине в течение 5–6 мес. происходят незначительные изменения в ее размере, а после 10 мес. хранения уменьшение размера становится уже более заметным. В связи с этим в нашем эксперименте повторные измерения проводили спустя 18 месяцев.

После некоторых доработок оригинального состава «Альдофикса» сотрудниками «Новохим» для эксперимента по фиксации было предложено

Таблица 1. Количество промеренных икринок минтая до и после фиксации разными способами, шт.
Table 1. The number of walleye pollock eggs measured live or fixed by different methods, specs

Эксперимент I Experiment I	Март 2018 г. (взятие проб) March 2018 (at sampling)	Сентябрь 2019 г. (измерение проб после фиксации) September 2019 (measuring after fixing)
Живая / Live	50	—
Формалин / Formalin	—	97
«Альдофикс» / «Aldofix»	—	85
Эксперимент II Experiment II	Апрель 2019 г. (взятие проб) April 2019 (at sampling)	Сентябрь 2019 г. (измерение проб после фиксации) September, 2019 (measuring after fixing)
Образец 1 / Example 1	100	75
Образец 2 / Example 2	100	76
Образец 3 / Example 3	90	86

три новых образца данного средства. В состав образца № 1 входили: диальдегид, проникающая добавка, поверхностно-активные вещества, вода; в образец № 2 — смесь диальдегидов, вода; в образец № 3 — диальдегид, спирт, вода.

Для второго эксперимента в 2019 г. икру отбирали в районе юго-восточной оконечности Камчатки, у мыса Лопатка, в одной точке, делая три облова сетью ИКС-80. Затем на палубе каждую пробу фиксировали новыми усовершенствованными образцами средства «Альдофикс».

Из каждой пробы отбирали и измеряли икринки минтая (24 апреля 2019 г.). Повторные промеры этой икры выполнили через 5 месяцев (табл. 1). Количество икринок сократилось ввиду механического воздействия на них препаровальной иглой при измерении.

Промеры икринок проводили под бинокулярным стереоскопическим микроскопом «Микромед» МС — 2 ZOOM. Во избежание индивидуальных ошибок измерения фиксированного материала проводились одним и тем же лицом. Фотографии зафиксированных икринок минтая выполнены с помощью бинокля Olympus SZX-7 с встроенной цифровой видеокамерой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

I эксперимент. Зафиксированная в 4%-м формалине икра помутнела и приобрела белесый оттенок. Желток просматривался плохо. Проба имела резкий неприятный запах, вызывающий слезотечение, головную боль, осложняющие условия обработки. Оболочка стала достаточно плотной и не рвалась от воздействия препаровальной иглой.

После фиксации икры минтая в «Альдофиксе» визуально цвет раствора не изменился, каких-либо

примесей не обнаружено. Цвет икры изменился. Желток просматривался четко, перивителлиновое пространство после фиксации помутнело и приобрело желтоватый оттенок. Форма икринок не изменилась, однако их оболочка стала менее плотной.

Наши наблюдения показывают, что фиксация формалином и средством «Альдофикс» отражается не только на сохранности общего вида икринок, но и на их диаметре. Данные, полученные в результате промеров икры в первом эксперименте, показывают, что под влиянием фиксации 4%-м формалином и «Альдофиксом» происходит ее сжатие. Как видно из рисунка 1, размеры фиксированных икринок спустя 18 мес. по сравнению с живой икрой уменьшаются: в формалине на 0,045 мм, в «Альдофиксе» на 0,080 мм.

По итогам первого эксперимента можно заключить, что оригинальное средство «Альдофикс» пригодно для фиксации «живой» икры минтая (свежепойманная), без планктонной массы (без ихтио- и зоопланктона). Однако для фиксации планктонных проб в рамках выполнения регулярных ихтиопланктонных съемок данное средство оказалось непригодным, т. к. все находящиеся в пробе организмы были слабо зафиксированы, имели мягкую структуру и через несколько дней приобрели коричневый цвет. Можно предположить, что такие изменения связаны с высокой жирностью планктонных организмов и с концентрацией действующего фиксирующего вещества в оригинальном средстве «Альдофикс».

II эксперимент. Новые три образца «Альдофикса», полученные для второго эксперимента, представляли собой жидкости без цвета и запаха. Проба, зафиксированная в образце № 1, не имела запаха, структура организмов осталась без измене-

Рис. 1. Диаметр икры минтая до фиксации и после фиксации в формалине и «Альдофиксе»
Fig. 1. The diameter of the walleye pollock eggs before and after fixing in formalin and “Aldofix”

ний. Обнаруженная в пробе икра минтая имела светло-желтый оттенок; оболочка икры была плотной, прозрачной, желток и эмбрион просматривались достаточно четко, затруднений в определении стадий развития не было (рис. 2).

Графическое изображение рядов (рис. 3), полученных в результате двукратного измерения, показывает последовательность изменений размера икры, зафиксированной в образце № 1, и смещение вершины кривой вправо. Таким образом, данные, полученные в результате промеров, показывают, что под воздействием «Альдофикса», представленного образцом № 1, происходит увеличение диаметра икры на 0,110 мм. Возможно, оно связано с тем, что действующие вещества данного фиксатора, проникая в икру через обо-

лочку, напитывают и расширяют клетки протоплазмы.

Проба, зафиксированная в образце № 2, приобрела темно-коричневый цвет, резкий запах йода и окислившегося рыбьего жира, структура организмов стала жесткой. Икра минтая имела коричневый оттенок, оболочка была плотной (рис. 4). При просмотре икры под микроскопом желток и эмбрион были слабо различимы и достаточно трудно поддавались определению по стадиям развития.

Данные, полученные в результате двукратных промеров (рис. 5), показывают, что под воздействием «Альдофикса» в образце № 2 также происходит незначительное увеличение икры. Диаметр икринок спустя 5 мес. после фиксации по сравнению с таковым у только зафиксированных

Рис. 2. Зафиксированная проба ихтиопланктона в «Альдофиксе» (образец № 1): А — общий вид планктона, Б — икра минтая
Fig. 2. The ichthyoplankton sample fixed in “Aldofix” (example № 1): А – general view of the plankton, Б – walleye pollock eggs

Рис. 3. Диаметр живой икры минтая и зафиксированной в «Альдофиксе» (образец № 1)
Fig. 3. The diameter of the walleye pollock live eggs and of the eggs fixed in “Aldofix” (example № 1)

реально не отличается, так как разница двух средних величин двух рядов составляет 0,048 мм.

Проба, зафиксированная в образце № 3, имела очень резкий запах, схожий с ацетоном. Планктонная масса приобрела светло-желтый цвет и была достаточно мягкой. После промывания пробы в проточной воде остался незначительный запах. Икринки имели желтоватый оттенок, тонкую непрозрачную оболочку (рис. 6). На начальных этапах развития икры определить стадию по желтку затруднительно.

Данные, полученные в результате двукратных промеров (рис. 7), показывают, что под влиянием

фиксации «Альдофиксом» образца № 3 происходит незначительное сжатие диаметра икры — на 0,006 мм.

По итогам второго эксперимента можно заключить, что внешний вид (несмотря на незначительное увеличение размеров) и качество икры минтая после фиксации только в усовершенствованном образце № 1 остались неизменными по сравнению с таковыми у живой. Таким образом, из трех новых предоставленных образцов «Альдофикса» лишь первый раствор может быть использован для фиксации проб при выполнении ихтиопланктонных съемок.

Рис. 4. Зафиксированная проба ихтиопланктона в «Альдофиксе» (образец № 2): А — общий вид планктона, Б — икра минтая
Fig. 4. The ichthyoplankton sample fixed in “Aldofix” (example № 2): A – general view of the plankton, Б – walleye pollock eggs

Рис. 5. Диаметр живой икры минтая и зафиксированной в «Альдофиксе» (образец № 2)
Fig. 5. The diameter of the walleye pollock live eggs and of the eggs fixed in “Aldofix” (example № 2)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для установления возможности использования в исследовательских работах по ихтиопланктону альтернативного фиксирующего средства «Альдофикс» были проведены серии экспериментов. В первом опыте проба, зафиксированная в «Альдофиксе», не имела какого-либо запаха, в то время как в формалине присутствовал резкий неприятный запах. Оболочка икринок в новом фиксаторе стала менее плотной. Сопоставление величины икры, фиксированной 4%-м формалином и «Альдофиксом», показывает, что под влиянием обоих фиксирующих растворов происходит ее сжатие. Во втором опыте проходили испытания трех новых усо-

вершенствованных по своим химическим свойствам фиксаторов «Альдофикс» (образец № 1, образец № 2, образец № 3). Проба, зафиксированная образцом № 1, не имела запаха, оболочки икринок приобрели светло-желтый оттенок, икринки были плотными, диаметр их увеличился на 0,11 мм. В образце № 2 присутствовал запах йода, икра имела темно-коричневый оттенок, диаметр ее увеличился на 0,048 мм. Проба, зафиксированная образцом № 3, имела резкий запах ацетона, икра приобрела желто-оранжевый оттенок, оболочка ее была мягкой, а диаметр уменьшился на 0,006 мм.

По итогам наших экспериментов наиболее приемлемым фиксатором для ихтиопланктона оказал-

Рис. 6. Зафиксированная проба ихтиопланктона в «Альдофиксе» (образец № 3): А — общий вид планктона, Б — икра минтая
Fig. 6. The ichthyoplankton sample fixed in "Aldofix" (example № 3): A – general view of the plankton, Б – walleye pollock eggs

Рис. 7. Диаметр живой икры минтая и зафиксированной в «Альдофиксе» (образец № 3)
Fig. 7. The diameter of the walleye pollock live eggs and of the eggs fixed in "Aldofix" (example № 3)

ся «Альдофикс» образца № 1, в котором цвет и внешний вид планктонных организмов в пробе после фиксации остались практически неизменными, что играет немаловажную роль при дальнейшей камеральной обработке.

Что касается диаметра икринок, то при хранении в усовершенствованном растворе «Альдофикса» (образец № 1) в течение 5 мес. их размеры увеличиваются на 7%, что вполне допустимо. С целью снижения токсической нагрузки на специалистов (обусловленной действием паров формальдегида) он может быть рекомендован в качестве фиксатора ихтиопланктонных проб.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны сотрудникам лаборатории морских рыб и экипажу НИС МРТК «Инженер Мартынов» за собранный материал.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Горбунова Н.Н. 1952. Влияние фиксации на величину икринок минтая *Theragra Chalcogramma* (Pallas) // Доклады АН СССР. Т. 82 (1). С. 163–164.

Григорьев И.П., Коржевский Д.Э. 2018. Современные технологии фиксации биологического материала, применяемые при проведении иммуногистохимических исследований (обзор) // Современные технологии в медицине. Т. 10. Вып. 2. С. 156–165.

Иптышев А.М., Доморацкая Е.А. 2017. Сравнительная характеристика возможностей препарирования и фиксации трупного материала, в том числе для изготовления гистологических препаратов, в различных растворах / Юбилейн. итог. студенч. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 140-летию проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого. С. 323–326.

Коржевский Д.Э. 2013. Фиксация материала для гистологического исследования / Морфологическая диагностика: подготовка материала для морфологического исследования и электронной микроскопии. Под ред. Д.Э. Коржевского. СПб. С. 10–25.

Новосадова А.В., Новосадов А.Г. 2015. О необходимости корректирующих коэффициентов при исследованиях фиксированной икры // Тр. ВНИРО. Т. 154. С. 80–83.

Перцева-Остроумова Т.А. 1961. Влияние фиксации на величину икринок, предличинок и личинок некоторых видов камбал семейства Pleuronectidae // Тр. ИО АН СССР. Т. 43. С. 337–345.

СанПиН 1.2.2353-08. Канцерогенные факторы и основные требования к профилактике канцеро-

генной опасности. 2008 // Бюллетень нормативных актов федеральных органов исполнительной власти, № 23. 09.06.2008.

REFERENCES

Gorbunova N.N. Effect of fixation of size of roe in *Tharagra chalcogramma* (Pallas). *Doklady AN SSSR*, 1952, vol. 82 (1), pp. 163–164. (In Russian)

Grigorev I.P., Korzhevskii D.E. Current Technologies for Fixation of Biological Material for Immunohistochemical Analysis (Review). *Sovremennye tehnologii v medicine*, 2018, vol. 10, pp. 156–165. (In Russian)

Iptyshev A.M., Domoratskaya E.A. *Sravnitel'naya kharakteristika vozmozhnostey preparirovaniya i fiksatsii trupnogo materiala, v tom chisle dlya izgotovleniya gistologicheskikh preparatov, v razlichnykh rastvorakh* [Comparative characteristics of the possibilities of preparation and fixation of cadaveric material, including for the manufacture of histological preparations, in various solutions]. Jubilee final student scientific-practical conference with international participation, dedicated to the 140th anniversary of Professor V.F. War-Yasenetsky, 2017, pp. 323–326.

Korzhevskiy D.E. *Fiksatsiya materiala dlya gistologicheskogo issledovaniya v kn: Morfologicheskaya diagnostika: podgotovka materiala dlya morfologicheskogo issledovaniya i elektronnoy mikroskopii* [Fixation of material for histological examination in Morfologicheskaya diagnostika: podgotovka materiala dlya morfologicheskogo issledovaniya i elektronnoy mikroskopii. In: Morphological diagnostics: preparation of material for morphological examination and electron microscopy]. Sankt-Peterburg, 2013, pp. 10–25.

Novosadova A.V., Novosadov A.G. About necessity of correcting coefficient at researches of sterlet eggs after fixation. *Trudy VNIRO*, 2015, vol. 154, pp. 80–83. (In Russian)

Pertseva-Ostroumova T.A. The effect of fixation on the size of eggs, larvae and larvae of some species of flounders of the Pleuronectidae family. *Trudy IO AN SSSR*, 1961, vol. 43, pp. 337–345. (In Russian)

SanPiN 1.2.2353-08. *Kantserogennyye faktory i osnovnyye trebovaniya k profilaktike kantserogennoy opasnosti* [Carcinogenic factors and basic requirements for the prevention of carcinogenic hazards]. Bulletin of regulatory acts of federal executive bodies, 2008, no. 23, 06.09.2008.

Статья поступила в редакцию: 13.02.2020

Статья принята после рецензии: 20.02.2020