ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ

им. А. О. КОВАЛЕВСКОГО

На правах рукописи

РАУЭН ТАТЬЯНА ВЛАДИМИРОВНА

УДК 639. 3:597. 556. 35

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЖИВЫХ КОМПОНЕНТОВ В СИСТЕМЕ ИСКУССТВЕННОГО ВОСПРОИЗВОДСТВА ЧЕРНОМОРСКОГО КАЛКАНА (*SCOPHTHALMUS MAEOTICUS*) (PISCES: SCOPHTHALMIDAE)

03.02.10 – гидробиология

Диссертация на соискание научной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
Ханайченко Антонина Николаевна,
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник

Севастополь – 2014

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 5
ВВЕДЕНИЕ 6
РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 13
1.1. Опыт выращивания атлантического тюрбо *Scophthalmus maximus* 14
1.2. Опыт выращивания черноморского калкана *Scophthalmus maeoticus* 16
1.3. Основные живые организмы, используемые при выращивании черноморского калкана. 19
1.4. Критические аспекты культивирования камбалообразных на примере атлантического тюрбо и черноморского калкана 25
1.4.1. Проблемы повышения эффективности выращивания коловраток *Brachionus plicatilis* 26
1.4.2. Микробиологические проблемы культивирования личинок тюрбо, черноморского калкана и их кормовых организмов 28
1.4.3. Проблема подготовки молоди черноморского калкана к выпуску в естественные места обитания 32
РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ 36
2.1. Объекты исследования 36
2.2. Методы водоподготовки 37
2.3. Методы культивирования живых кормовых организмов 38
2.4. Методы получения посадочного материала и инкубации икры 38
2.5. Методы определения динамики численности и размеров организмов, проточная цитометрия 39
2.6. Методы проведения экспериментов 41
2.6.1. Определение продукционных показателей коловраток при их питании микроводорослями разных таксономических групп 41
2.6.2. Изучение влияния пищевой адаптации на видовую и размерную селективность питания коловраток 44

2.6.3. Определение влияния химического антибактериального средства (хлорамфеникола) на динамику численности бактерий в среде выращивания *Isochrysis galbana* и *Brachionus plicatilis* 45
2.6.4. Исследование влияния микроводорослей и их фильтратов на рост бактериальной микрофлоры в средах инкубации икры черноморского калкана и выращивания его личинок.....46
2.6.5. Изучение эффекта микроводоросли *Chlorella vulgaris* на интенсивность бактериальной колонизации покровов науплиев артемии и динамику численности бактерий в среде их выращивания 49
2.6.6. Определение динамики численности бактерий в среде инкубации икры и степени бактериальной колонизации её поверхности при различных методах обработки.....51
2.6.7. Разработка принципов адаптации и подготовки молоди калкана к выпуску в естественные места обитания.....55
2.6.8. Статистическая обработка, представление результатов 58
2.6.9. Объём проанализированного материала Статистическая обработка, представление результатов.....58
РАЗДЕЛ 3. ПРОДУКЦИОННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ И СЕЛЕКТИВНОСТЬ ПИТАНИЯ КОЛОВРАТОК *BRACHIONUS PLICATILIS* ПРИ ПИТАНИИ МИКРОВОДОРОСЛЯМИ РАЗНЫХ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ГРУПП.....60
3.1. Основные продукционные показатели коловраток при питании микроводорослями разных таксономических групп 60
3.2. Влияние пищевой адаптации коловраток на видовую и размерную селективность их питания.....70
РАЗДЕЛ 4. КОНТРОЛЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КОНТАМИНАЦИЙ В СИСТЕМЕ ВЫРАЩИВАНИЯ КАЛКАНА И ЕГО КОРМОВЫХ ОРГАНИЗМОВ 73

4.1. Применение хлорамфеникола при культивировании микроводоросли *Isochrysis galbana* и коловраток *Brachionus plicatilis* 73
4.2. Влияние микроводорослей и их фильтратов на рост бактериальной микрофлоры в средах инкубации икры и личинок калкана 79
4.3. Влияние микроводоросли *Chlorella vulgaris* на динамику численности бактерий в среде выращивания артемии *Artemia salina* и интенсивность бактериальной колонизации покровов её науплиев 86
4.4. Динамика численности бактерий в среде инкубации икры и интенсивность бактериальной колонизации её поверхности при различных методах обработки 93
РАЗДЕЛ 5. ПОДГОТОВКА МОЛОДИ ЧЕРНОМОРСКОГО КАЛКАНА К ВЫПУСКУ В ЕСТЕСТВЕННЫЕ МЕСТА ОБИТАНИЯ 101
5.1. Оценка калорийности и усвояемости различных кормов молодью калкана 101
5.2. Оценка избирательности гаммарид молодью черноморского калкана .. 103
5.3. Влияние субстрата на поведение искусственно выращенной молоди черноморского калкана 104
5.4. Определение термопреферендума молоди калкана 107
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 110
ВЫВОДЫ 112
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 114

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВНЖК – высоконенасыщенные жирные кислоты;

ВСХ клетки – клетки с высоким содержанием хлорофилла;

КО – кормовые организмы;

ИБК – интенсивность бактериальной колонизации;

ИнБЮМ НАНУ – Институт биологии южных морей Национальной академии наук Украины;

кл. – клетки;

мг – миллиграмм;

мин – минута;

мкг – микрограмм;

мкм – микрометр;

НСХ клетки – клетки с низким содержанием хлорофилла;

ПМВ – подготовленная морская вода;

с – секунда;

СВЛ – среда выращивания личинок;

СИИ – среда инкубации икры;

сут – сутки;

ч – час;

экз. – экземпляр;

AHL – ацил-гомосерин лактон;

F – скорость фильтрации микроводорослей коловратками , мкл·экз. $^{-1}$·ч$^{-1}$;

G – индивидуальный рацион коловраток, мкг сыр. массы·экз.$^{-1}$·ч$^{-1}$;

K_1 – эффективность роста коловраток, %;

P – индивидуальная продукция коловраток, мкг сыр. массы·экз$^{-1}$·ч$^{-1}$;

QS – кворумная сигнализация;

μ, сут$^{-1}$ – удельная скорость роста;

μ_{M65} сут$^{-1}$ – удельная скорость роста бактерий на питательной среде М 65

ВВЕДЕНИЕ

Камбала калкан *Scophthalmus maeoticus* (Pallas, 1814) (синонимы *Psetta maeotica* (Pallas,1814), *Psetta maxima maeotica* (Pallas, 1814) [87] – один из традиционных промысловых объектов черноморского региона. В настоящее время запасы этого вида находятся в депрессивном состоянии, чему способствовал ряд факторов: антропогенное загрязнение среды обитания калкана, нарушение его биоценоза в результате неконтролируемого донного тралового промысла, а также невозможность быстрого восстановления популяции калкана вследствие длительного полового созревания его особей. Кроме того, черноморский калкан характеризуется низкой эффективностью воспроизводства: численность отдельных поколений в промысловом возрасте составляет 0,002 % от количества выметанной икры (индивидуальная плодовитость - до 14 млн. икринок) [28]. Однако основной причиной снижения промыслового запаса калкана является чрезмерный вылов этого вида, в том числе браконьерский и неучтённый [13]. Промышленный лов калкана начался в XIX веке, в XX веке его активно ловили все причерноморские страны. В 1985 г. общий вылов калкана снизился до рекордно низкого уровня за все годы эксплуатации запасов этого вида рыб – 527 т [13]. С 1986 по 1994 г. был введен запрет на лов калкана, благодаря которому в 1991 г. его промысловый запас на шельфе Украины возрос до 8,8 тыс. т, а в 1996 г. – до 14 тыс. т [49], однако дальнейшая интенсификация промысла снова привела к снижению объёма вылова данного вида (2006 г. – около 10 тыс. т) [13]. В 2011 г. промысловый запас черноморского калкана оценивался в 11,5 тыс. т, но имел тенденцию к снижению [34]. Последние десять лет опасение вызывает не только снижение численности данного вида в прибрежных водах Севастополя, но и изменения основных биологических показателей его особей, которые особенно отчетливо проявились в 2007 г. (за весь период наблюдений с 1998 г.) [13]. На фоне создавшейся ситуации проблема искусственного разведения черноморского калкана является крайне актуальной.

Актуальность темы. Учитывая мировой опыт культивирования камбалообразных, можно утверждать, что калкан является перспективным объектом товар-

ного выращивания. Он обладает ценными пищевыми качествами, высокой плодовитостью и быстрым темпом роста [36].

Однако данный вид относят к проблемным объектам марикультуры, так как до сих пор существуют некоторые ограничения его искусственного воспроизводства, в частности: 1. Необходимость использования живых кормовых организмов (КО) – микроводорослей, коловраток, артемий, технологии выращивания которых требуют оптимизации; 2. Вероятность высокой смертности личинок, обусловленной бактериальными контаминациями сред выращивания и отсутствием адекватных методов снижения численности бактерий в них; 3. Низкая выживаемость искусственно выращенной молоди калкана при зарыблении, обусловленная отсутствием её предварительной адаптации к естественной среде обитания.

Для успешного выращивания калкана, создания оптимальных условий выращивания его личинок и их кормовых организмов, необходимо учитывать взаимодействие всех живых компонентов (микроводоросли, коловратки, артемия, икра, личинки, бактерии и т.д.), используемых в искусственной системе культивирования данного вида.

Актуальность данной работы заключается в необходимости изучения взаимодействия живых компонентов (микроводоросли, зоопланктон, бактерии, икра, личинки) в системе искусственного воспроизводства калкана и исследования экологических и этологических особенностей его мальков с целью повышения эффективности выращивания данного вида рыб. Оптимизация культивирования кормовых организмов калкана, разработка комплекса мер по снижению бактериальной контаминации сред выращивания и принципов адаптации молоди к естественным условиям перед зарыблением позволят как повысить эффективность её выращивания для товарного производства, так и увеличить численность данного вида рыб в Черноморском регионе за счет восполнения его естественной популяции адаптированной, жизнестойкой молодью при зарыблении.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Диссертационная работа выполнена в отделе аквакультуры и морской фармакологии Института биологии южных морей им А.О.Ковалевского в соответствии с научно-

исследовательской тематикой, программами НАНУ и МОН Украины: «Исследование факторов поддержания устойчивости морских экосистем» (№ ГР 0103U001048; 2003-2007 гг.); «Изучение функционирования морских биотехнологических комплексов и их взаимодействия с окружающей средой» (№ ГР 0I06U00I586; 2006-2010 гг.); «Систематизированный анализ и комплексная оценка современного состояния изученности биологических ресурсов Азово-Черноморского бассейна и перспектив развития марикультуры, ресурсных био- и нанобиотехнологий» (№ ГР 0107U008034; 2007-2009 гг.); «Экологические взаимодействия в биотехнологических комплексах» (№ ГР 0111U00154; 2011-2015 гг.); «Проведение комплексных экологических, гидробиологических и биотехнологических исследований с целью решения фундаментальных и прикладных проблем постоянного использования ресурсного потенциала, восстановления и сохранения морского биоразнообразия и качества морской среды Азово-Черноморского региона» (№ ГР 0110U006203; 2010-2012 гг.). В перечисленных темах соискатель участвовал в качестве исполнителя.

Цель и задачи исследования. Цель работы - усовершенствовать технологии культивирования черноморского калкана, изучив взаимодействие живых компонентов в системе его искусственного воспроизводства.

Цель работы определила следующие задачи:

- Определить влияние пищевой адаптации на селективность питания коловраток *Brachionus plicatilis* и их продукционные показатели при питании микроводорослями различных таксономических групп;
- Выявить влияние хлорамфеникола, микроводорослей и их фильтратов на численность бактерий в среде культивирования микроводоросли *Isochrysis galbana*, коловраток *Brachionus plicatilis*, ракообразных *Artemia salina*, икры и личинок калкана;
- Изучить влияние микроводоросли *Chlorella vulgaris* на интенсивность бактериальной колонизации поверхности науплиев артемии;
- Сравнить воздействие озона и микроводоросли *Chlorella vulgaris* на численность бактерий в среде инкубации икры калкана и интенсивность бактериальной колонизации поверхности икринок;

- Разработать схему адаптации выращенных мальков калкана к выпуску в естественную среду, и с этой целью:
- Оценить усвояемость инертных (фарш кальмара, ставриды), и живых (артемия, копеподы, нереис, гаммариды) кормов и размерную избирательность гаммарид выращенной метаморфизированной молодью калкана;
- Определить термопреферендум выращенной молоди калкана, длительность её адаптации и формирования естественных поведенческих реакций при внесении субстрата, свойственного природному биотопу.

Объект исследования – культуры одноклеточных микроводорослей: *Chlorella vulgaris* Beijer., 1890*, Platymonas viridis* Rouch*, Dunaliella salina,* Teod., 1905, *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) G. Fryxell et Hasle, 1977, *Isochrysis galbana* Parke, 1949, *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, 1897; коловратки *Brachionus plicatilis* Müller, 1786; артемия *Artemia salina* Linnaeus, 1758; гетеротрофные бактерии; икра и личинки *Scophthalmus maeoticus* Pallas, 1814.

Предмет исследования – трофические и микробиологические аспекты культивирования личинок калкана и их кормовых организмов. Формирование норм естественных поведенческих реакций у искусственно выращенной молоди калкана.

Методы исследования. Методы культивирования гидробионтов разработанные в отделе аквакультуры и морской фармакологии, традиционные методы сбора материала, применяемые в ихтиологии; цитометрические методы определения размерных характеристик и численности клеток микроводорослей и бактерий; методы определения численности и биомассы фито- и зоопланктоных организмов [106]; световая и эпифлуоресцентная микроскопия, микровидеосъёмка; статистические методы анализа данных Excel 7.0, Grapher 2.0).

Научная новизна работы. Впервые выявлено влияние предварительной пищевой адаптации коловраток *B. plicatilis* к определенному виду микроводорослей на селективность их питания. Определены основные продукционные показатели *B. plicatilis* при питании микроводорослями разных таксономических групп, подобраны виды микроводорослей, повышающие продукцию коловраток в короткие сроки, что позволяет оптимизировать методику их культивирования. Впервые разработана

новая эффективная методика применения микроводоросли *Ch. vulgaris* и её фильтрата в качестве антибактериального средства на основных, проблемных в микробиологическом отношении, ранних этапах культивирования калкана и его кормовых организмов. Впервые разработаны основные принципы подготовки выращенной жизнестойкой молоди калкана к естественным условиям обитания перед её выпуском в море.

Практическое значение работы. Полученные результаты и разработанные на их основе рекомендации вносят значительный вклад в решение актуальных проблем культивирования черноморского калкана, связанных с технологическими ограничениями в общепринятой методике производства данного вида.

Введение в рацион коловраток микроводоросли *Ph. tricornutum* в комплексе с предварительной трофической адаптацией животных к данному виду фитопланктона позволит оптимизировать технологию выращивания *B. plicatilis*, значительно повысив их продукционные показатели.

Предложенный метод использования микроводорослей *Ch. vulgaris* с целью снижения численности бактерий в средах выращивания личинок калкана и их кормовых организмов представляется перспективным, поскольку является доступным, эффективным и позволяет снизить риск, сопряженный с применением антибиотиков.

Данные, полученные при исследовании питания, калорийности и усвояемости различных видов корма мальками калкана, являются основой для составления рациона, позволяющего повысить иммунитет, нарастить мышечную массу и выработать навыки пище-поисковых реакций у молоди, подготавливаемой к выпуску в море.

Разработанная оригинальная методика подготовки искусственно выращенных мальков черноморского калкана к выпуску в естественные места обитания позволит повысить процент их выживаемости в природе и восполнить естественную популяцию данного вида рыб.

Личный вклад соискателя. Автором самостоятельно осуществлены все этапы научного исследования: формулировка задач, выбор методов, анализ

материалов по биологии, экологии микроводорослей, коловраток и личинок калкана. В диссертации использованы материалы, полученные при активном участии автора в экспериментальных сезонах по искусственному выращиванию камбалы калкан с 2006 по 2013 гг. Диссертант принимал непосредственное участие в проведении экспериментальных работ с икрой, личинками и мальками черноморского калкана, культивировании 8 видов микроводорослей и коловраток *B. plicatilis*; получении и содержании науплиев артемий. Все экспериментальные исследования были выполнены диссертантом при консультациях с его научным руководителем. При консультативной помощи с.н.с. отдела физиологии животных и биохимии ИнБЮМ, к.б.н. З. А. Романовой освоен метод оценки калорийности и усвояемости различных видов корма.

В процессе подготовки к исследованиям по определению влияния различных методов снижения численности бактерий в средах инкубации икры и выращивания личинок калкана автором освоен современный метод проточной цитометрии. Цитометрические исследования динамики численности микроводорослей и бактерий в средах выращивания личинок калкана и его кормовых организмов проводились автором при совместной работе с сотрудниками отдела планктона ИнБЮМ: зав. лаб. микропланктона к.б.н. В. С. Мухановым и вед. инж. С. С. Свининым.

Апробация работы. Основные положения работы были доложены на международных научных конференциях и семинаре: конференциях молодых ученых Pontus Euxinus V, VI, VII, VIII (Севастополь, 2007, 2009, 2011, 2013); II международной научно-практической конференция «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов» (Борок-Москва, 17-20 июля 2007 г.); Международном научно-техническом семинаре «Системы контроля окружающей среды – 2010», (Севастополь, 13-17 сентября 2010 г.);; II всеукраїнській науково-практичній конференції студентів та молодих вчених: «Актуальні проблеми та перспективи розвитку природничих наук» (Запорожье, 20 мая 2011 г.); II международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых: «Фундаментальные и прикладные исследования в биологии» (Донецк, 19-22 сентября 2011 г.);

World Conference on Marine Biodiversity 2011 (Aberdeen, Scotland (UK), 26 – 30 September 2011); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2013» (Севастополь, 25 – 26 апреля 2013 г.)

Публикации. Основные результаты диссертационной работы отражены в 17 публикациях. Из них 5 статей (1 без соавторов и 4 - с соавторами) опубликованы в специализированных изданиях, рекомендованных ВАК; 2 статьи – в других журналах, 9 тезисов конференций, 1 патент. В статьях, опубликованных в соавторстве, вклад соискателя состоял в постановке задач, разработке методики исследования, активном участии в анализе полученных результатов и написании текста статьи. Права соавторов публикаций не нарушены.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, 5 разделов, заключения, выводов и списка использованных источников (49 отечественных и 104 иностранных). Работа изложена на 130 страницах машинописного текста, иллюстрирована 61 рисунком и 8 таблицами.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю к.б.н. А. Н. Ханайченко за всестороннюю помощь и интерес к работе, зав. лаб., к.б.н. В. С. Муханову за совместно выполненную часть исследований, постоянную помощь и поддержку в написании работы. За научные консультации проф. д.б.н. А. В. Гаевской, проф. д.б.н. Ю. Н. Токареву, к.б.н. В. И. Холодову, к.б.н. В. Е. Гирагосову, к.б.н. Ю. В. Корнийчук, зав. науч. библ О. А. Акимовой, н.с. Л. А. Манжос. За помощь в проведении экспериментов автор благодарен к.б.н. З. А. Романовой, вед. инж. Д. В. Ельникову. За ценные советы и дружескую поддержку автор искренне признателен всему коллективу отдела аквакультуры и морской фармакологии, отдела планктона и сотрудникам других отделов ИнБЮМ.

РАЗДЕЛ 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

По данным ФАО рыба и морепродукты являются основным источником белка для более 50% населения планеты [16]. Однако в последние десятилетия в мире наблюдается спад промышленного рыболовства, что связано с исчерпанием запасов водных биоресурсов [24]. Многие страны переключились на аквакультуру – искусственное воспроизводство водных организмов. Её продукция ежегодно возрастает на 8 - 10 %, и в 2008 г. товарная аквакультура за рубежом обеспечила около 48% мировой продукции гидробионтов [24]. В 2011 г. объём мирового производства аквакультуры составил 134,5% по отношению к 2006 г. [21]. Марикультура – культивирование морских организмов составляет 58 % от объёма производства мировой аквакультуры [16]. Наиболее распространенными объектами марикультуры являются водоросли, моллюски, ракообразные и в меньшем объёме морские рыбы. Однако с внедрением новых биотехнологических разработок продукция морских рыб с каждым годом увеличивается. В число наиболее успешно культивируемых ценных пород рыб входят камбалообразные.

Систематическая исследовательская работа по искусственному выращиванию камбалообразных началась в Великобритании в 1952 г. Первые успешные эксперименты по выращиванию личинок камбалообразных с завершением метаморфоза были осуществлены на камбале *Pleuronectes platessa* L. Однако промышленное выращивание этого вида не получило развития, что было обусловлено высокой себестоимостью его культивирования [129]. Наиболее перспективными оказались работы с тюрбо *Scophthalmus maximus*, промышленное производство которого успешно развивается во многих странах. Опыт его культивирования важен для разработки методик выращивания черноморского калкана, т.к. эти виды являются близкородственными.

1. 1. Опыт искусственного выращивания атлантического тюрбо *Scophthalmus maximus*

Тюрбо - *Scophthalmus maximus*, ранее *Psetta maxima* или *Rhombus maximus,* донный вид, обитающий у европейского побережья Атлантического океана, в Средиземном, Северном и Балтийском морях на глубине 20-70 м.

Первые положительные результаты по выращиванию личинок тюрбо, прошедших стадию метаморфоза получены в 1972 г. в Лоуфстофте (Великобритания) [128]. Уже в 1976 г. в Великобритании были выращены и проданы первые 10 т этой рыбы, а в 1985 г. годовая продукция тюрбо составила уже 80 т товарной массы и 200 тыс. экземпляров молоди (рис. 1. 1). В дальнейшем производители тюрбо в Великобритании сосредоточились преимущественно на выращивании молоди для экспорта и инвестировании данной отрасли аквакультуры за рубежом [46].

Рис. 1. 1. Искусственно выращенная молодь тюрбо (Франция, France Turbot).
Фото URL: http://www.stolt-nielsen.com/Stolt-Sea-Farm.aspx,

В начале 1980-х г. промышленным культивированием тюрбо занялись в странах Северной Европы: Норвегии, Шотландии, Дании, где в результате исследований в рамках совместных проектов частных компаний и научно-исследовательских институтов стало очевидно, что культивирование тюрбо до рыночных размеров в холодных водах нерентабельно, и производители северно-европейских стран переориентировались на выращивание молоди тюрбо (массой 2-5 г) [46]. В конце 1980-х г. к

странам, занимающимся культивированием тюрбо, присоединились аквакультурные предприятия Чили, где уже в 1995 г. производилось около 100 т этого вида рыб [46].

В начале 1990-х г. появление современных биотехнологических разработок дало мощный толчок развитию производства тюрбо во многих европейских странах. Во Франции с 1990 по 1995 гг. оно возросло с 15 до 700 т [46]. Больших успехов в этой области достигла Испания, где к концу 90-х годов насчитывалось уже 16 крупных предприятий по выращиванию тюрбо [31]. К 1995 г. искусственное производство *S. maximus* в мире увеличилось со 100 до 2800 т в год [100] и продолжало неуклонно расти. По данным ФАО на 2011 г. общая европейская аквакультурная продукция тюрбо составила 10,8 тыс. т, на 32, 6 % больше чем в 2010 г. В 2011 г. рост продукции тюрбо был отмечен в Португалии (2,2 тыс. т – 23% от общей европейской продукции). Лидирующие позиции в производстве данного вида в Европе занимает Испания (7, 8 тыс. тонн - 72% от общей европейской продукции), 300 тонн тюрбо производится в Чили, а мировым лидером, по оценкам экспертов ФАО, является Китай, где производят не менее 60 тыс. тонн тюрбо в год. Таким образом, общемировая годовая продукция тюрбо составляет около 70 тыс. т [31]. Специалисты прогнозируют дальнейший рост производства данного вида, как в Европе, так и в мире [119]. Такое развитие производства тюрбо определяется спросом на данный объект на европейском и мировом рынке, его вкусовыми качествами и технологичностью культивирования.

В Черном море обитает близкородственный тюрбо вид – камбала калкан *S. maeoticus* - традиционный объект промысла данного региона. Последние десятилетия популяция калкана находится в депрессивном состоянии, что связано с неконтролируемым выловом этого вида и антропогенным загрязнением среды его обитания. В связи с этим проблема искусственного разведения и расширенного воспроизводства калкана в промышленном масштабе уже многие годы является актуальной. Анализ опыта культивирования атлантического тюрбо может быть крайне полезен при организации промышленного выращивания черноморского калкана, т. к. ряд морфологических и генетических исследований указывает на то, что калкан является

конспецифичным атлантическому тюрбо [59], соответственно, технология их культивирования не будет иметь принципиальных отличий.

1. 2. Опыт выращивания черноморского калкана *Scophthalmus maeoticus*

Биологическая характеристика калкана. Черноморский калкан, или *Scophthalmus maeoticus*, - донный вид, обитающий на песчано-илистых грунтах вдоль всего побережья Черного моря. Локальные стада калкана совершают миграции в пределах основного ареала нерестовые к берегам весной и нагульные осенью [36]. Продолжительность жизни калкана составляет 14-16 лет [37]. Половозрелости самцы достигают в 5-6 лет, самки - в 6-8 лет [46].

Икрометание происходит с конца марта-апреля до второй половины июня на глубине от 20 до 60 м при температуре 8-12 °С [47]. Плодовитость самок составляет от 1,8 до 14 млн. икринок [28, 29], но в естественных условиях до стадии выклева личинки доживает только 1% от оплодотворенной икры [36]. Особенностью онтогенеза калкана является длительный и сложный метаморфоз, в процессе которого билатерально симметричные личинки, ведущие пелагический образ жизни, не связанный с придонными слоями, проходят перестройку всех систем организма, превращаются в асимметричных, уплощенных дорсально-вентрально рыб и становятся бентическими формами. Взрослые особи калкана обитают при относительно стабильной придонной температуре 8-10 °С, нерест протекает при 10-15 °С, пелагическая икра развивается в поверхностных водах при температуре от 10 до 16 °С, а личинки и молодь в температурном диапазоне 17-24 °С [46].

Искусственное разведение. Работы по искусственному разведению калкана на Черном море были начаты в 1970-х г. в АзЧерНИРО и ВНИРО. В это же время в ИнБЮМ АН УССР под руководством к.б.н. А. В. Чепурнова была организована лаборатория (при отделе ихтиологии ИнБЮМ) по культивированию морских рыб, где выполнялись фундаментальные исследования с целью разработки основ искусственного выращивания личинок калкана в замкнутых экосистемах [43]. В

ИнБЮМ были выполнены работы по исследованию развития личинок и мальков калкана в искусственных условиях, проанализированы особенности прохождения личинками метаморфоза [32]. Под руководством к.б.н. Ю. Е. Битюковой разработана методика получения жизнестойкой молоди данного вида [128], защищенная патентом, а позднее произведено пилотное выращивание первой опытной партии молоди калкана до возраста 10 мес. [28]. В дальнейшем работа ИнБЮМ была направлена на усовершенствование методов выращивания жизнестойкой молоди черноморского калкана с правильным завершением метаморфоза и оптимизацию физических и биологических условий культивирования данного вида на разных этапах его развития. К 2010 г. была разработана технологическая схема выращивания правильно метаморфизированных мальков калкана [33].

В России в 1995 г. государственной научно-технической программой "Перспективные процессы в перерабатывающих отраслях АПК" черноморская камбала-калкан была определена одним из основных объектов проекта "Марикультура рыб" [23]. На базе ВНИРО (Большой Утриш) под руководством к.б.н. Масловой О. Н. на основе опыта европейских питомников камбалы тюрбо и собственных исследований по калкану была разработана биотехнология выращивания черноморского калкана, позволяющая получать молодь с быстрым темпом роста, сформировано ремонтно-маточное стадо и получены опытные партии жизнестойкого рыбопосадочного материала [23].

В рыбопитомнике на производственной базе ООО «Одесский осетроводческий комплекс» и ООО «ХТМО» (Хозрасчетное территориальное межотраслевое объединение) совместно с сотрудниками ЮгНИРО в период с 1990 по 2000 гг. производили работы по выращиванию молоди черноморского калкана [42]. Однако с 2001 г. в силу экономических причин дальнейшие работы не выполнялись [42]. В 2011 г. сотрудниками ЮгНИРО по заданию Госрыбагенства рыбного хозяйства Украины, был подготовлен проект рыбоводно-биологического обоснования на создание комплекса по воспроизводству морских видов рыб в АР Крым [30]. В 2012 году были начаты исследования по формированию ремонтно-маточного стада черноморского калкана в условиях бассейнового хозяйства науч-

но-исследовательской базы ЮгНИРО, расположенной на побережье Керченского пролива в 5 км от выхода в Черное море. Получены данные по выращиванию молоди калкана в экстенсивных условиях при использовании в качестве корма смеси искусственно выращенных и добываемых из солоноватых прудов кормовых организмов [15].

В причерноморском регионе попытки освоения интенсивного культивирования калкана были предприняты Турцией (Трабзон), и в 1996 г. начался совместный японско-турецкий проект при финансовой и научной поддержке японского агентства JICA [46]. В результате 7,5- летнего сотрудничества были разработаны основные методики выращивания калкана и получены первые партии подрощенной молоди, однако в 2004 г. участники проекта столкнулись с проблемой неправильной пигментации мальков и поражения личинок вирусной геморрагической септицемией (VHS) и водянкой, повлекшей за собой гибель личинок. Это определило необходимость разработки методов профилактики данных заболеваний, дезинфекции инкубаторов и совершенствования системы водоподготовки. Таким образом, культивирование черноморского калкана, как альтернатива его промыслу, пока остается на уровне выращивания опытных партий этого вида рыб.

Перспективы выращивания калкана. Успехи, достигнутые специализированными научными группами биологов Украины (ИнБЮМ НАНУ, ЮгНИРО), России (ВНИРО) и Турции (JICA, CFRI) в разработке биотехнологии производства калкана, позволяют утверждать, что при должном финансировании культивирование данного вида, как с целью зарыбления, так и промышленного выращивания, может быть рентабельным. Сходство биологических характеристик *S. maximus* и *S. maeoticus* [10, 59], за исключением оптимума солености воды, определяет возможность использования многолетнего практического опыта товарного выращивания атлантического тюрбо европейскими странами, что облегчает разработку биотехнологии культивирования калкана. Однако целесообразность проведения экспериментальных работ по совершенствованию методик культивирования калкана, которые продолжают проводиться сотрудниками ИнБЮМ, обоснована тем, что многие технологические приемы, разработанные зарубежными фирмами для других ви-

дов камбалообразных, во-первых, не всегда отвечают биологическим особенностям черноморского калкана и, во-вторых, являются объектом права интеллектуальной собственности - дорогим коммерческим продуктом [46]. Кроме того, несмотря на успешные биотехнологические разработки в области культивирования тюрбо, в данном секторе аквакультуры существует ряд нерешённых проблем, которые препятствуют повышению эффективности и объёмов производства данного вида. С теми же трудностями сталкиваются специалисты по выращивания черноморского калкана.

Основными проблемами при выращивании как тюрбо, так и черноморского калкана являются: 1) необходимость повышения эффективности культивирования живых кормовых организмов калкана (КО) – неотъемлемого компонента технологической схемы воспроизводства калкана; 2) бактериальные контаминации сред выращивания икры и личинок и их кормовых организмов; 3) низкая выживаемость искусственно выращенной молоди при зарыблении, обусловленная отсутствием её предварительной адаптации к естественной среде обитания.

Учитывая вышесказанное, а также повышенный интерес коммерческих предприятий к выращиванию калкана, можно утверждать, что при решении перечисленных проблем, а также адекватной финансовой и юридической поддержке различных государственных и частных структур товарное выращивание *S. maeoticus* на побережье Черного моря имеет шансы на успешное развитие и может способствовать сохранению и рациональному использованию природных популяций данного вида.

1. 3. Основные живые организмы, используемые при выращивании черноморского калкана.

Искусственное выращивание камбалообразных предполагает непременное введение в рацион личинок кормовых организмов (КО) - микроводорослей, коловраток, копепод, науплиальных стадий артемий. Такая необходимость обусловлена экологическими и этологическими особенностями калкана на ранних стадиях развития. В частности характерной особенностью стадии пелагических личинок калкана

является облигатное питание живыми планктонными организмами [152]. При искусственном выращивании калкана используют различные КО, их выбор зависит от стадии развития личинок, их размера и потребностей.

1. Микроводоросли - базовое звено пищевой цепи при выращивании личинок калкана. Применение микроводорослей обусловлено несколькими причинами:

а) высоким содержанием в некоторых видах микроводорослей полиненасыщенных жирных кислот (ж.к.) – важного биохимического компонента, необходимого для нормального развития личинок [2]. Беспозвоночные КО не-морского происхождения (коловратки *Brachionus plicatilis*, артемии), используемые при выращивании камбалообразных, не способны самостоятельно синтезировать эти кислоты и не являются кормом, адекватным пищевым потребностям личинок. Насыщение этих организмов микроводорослями, содержащими незаменимые жирные кислоты, делает их более полноценными в кормовом отношении для личинок морских рыб [150];

б) возможностью использования некоторых видов микроводорослей в технологии «зеленая вода» - добавление культур непосредственно в среду выростных систем личинок с целью улучшения её качества. Присутствие микроводорослей в среде выращивания личинок (СВЛ) стабилизирует кислородный режим и pH воды. Установлено, что использование этой технологии обеспечивает более синхронный переход личинок на внешнее питание;

в) наличием у некоторых видов микроводорослей антибиотического эффекта. Определено, что добавление в среду выращивания личинок культур микроводорослей с данным эффектом снижает в ней численность условно патогенных бактерий и положительно влияет на формирование внутренней микрофлоры личинок до начала внешнего питания [114].

Выбор видов микроводорослей при культивировании личинок калкана обусловлен, помимо вышеперечисленных особенностей, размерными характеристиками их клеток, а также технологичностью производства: культивируемые водоросли должны легко адаптироваться к условиям массового выращивания, характеризоваться высокими темпами роста на искусственной питательной среде Уолна [72] и отсутствием аутоингибирования при высокой концентрации клеток. В технологиче-

ской схеме выращивания личинок калкана и их кормовых организмов на экспериментальной базе ИнБЮМ НАНУ используют комплекс видов микроводорослей как из стандартно применяемых в ларвикультуре тюрбо *S. maximus* [132], так и введенных в практику культивирования на основании собственных исследований (табл. 1.1).

Таблица 1. 1

Размерные характеристики и область применения микроводорослей, используемых при выращивании камбалы калкан

Вид микроводорослей	Длина клетки (мкм)	*** Область применения**	Класс
Isochrysis galbana	3 – 5	1 - 5	Prymnesiophyceae
Chlorella vulgaris	2 – 4	3, 4	Trebouxiophyceae
Phaeodactylum tricornutum	4 – 5	1, 6	Bacillariophyceae
Tetraselmis suecica	7 – 14	1, 3, 4, 6	Prasinophyceae

*** Область применения**:

1. Выращивание культур коловраток
2. Насыщение метанауплиев артемий перед кормлением личинок
3. Стабилизация среды выращивания личинок
4. Ингибирование прокариот
5. Насыщение кормов для повышения ДГК (докозагексаеновой ж. к.)
6. Насыщение кормов для повышения ЭПК (эйкозапентаеновой ж. к.)

Применение разных видов микроводорослей обусловлено тем, что каждый вид обладает определёнными свойствами, которые используют на том или ином этапе выращивания калкана: различный биохимический состав, наличие или отсутствие фактора, ингибирующего рост бактерий, технологичность культивирования. Различные биохимические потребности кормовых организмов также определяют необходимость использования различных видов микроводорослей.

Так, если периодические культуры солоноватоводных коловраток *B. plicatilis* можно содержать, используя зелёные водоросли, то для культивирования копепод, еще одного кормового организма в технологии выращивания калкана, необходимы иные классы микроводорослей. Многостороннее и эффективное использование микроводорослей, делает их незаменимой составляющей в технологической схеме выращивания камбалообразных.

2. Коловратки – незаменимый стартовый живой корм для личинок калкана. Малые размеры, невысокая подвижность и толерантность к аутоингибированию при высоких плотностях определяют их технологичность при выращивании в массовых культурах. При искусственном культивировании молоди калкана используют облигатно партеногенетические клоны коловраток *Brachionus plicatilis*, которые состоят из амиктических диплоидных самок, воспроизводящих себе подобных, полностью идентичных дочерних особей с диплоидным набором хромосом. Эти клоны очень технологичны в эксплуатации, так как их продукционные показатели значительно выше циклично партеногенетических культур коловраток и легко поддаются регулированию. По типу питания коловратки *B. plicatilis* являются седиментаторами (вертикаторами) [20] и могут питаться бактериями, микроводорослями и дрожжами [134].

3. Артемии – относятся к группе жаброногов (Anostraca), сем. Artemiidae, отряду листоногих рачков (Euphylopoda) и распространены практически повсеместно в прибрежных и континентальных соленых озерах и искусственных солеварнях с повышенной соленостью (от 25 до 250‰), расположенных в тропических, субтропических и умеренных климатических зонах. Во всем мире до настоящего времени обнаружено около десятка видов артемий, в их числе, так называемый партеногенетический вид (*Artemia parthenogenetica*) и ряд бисексуальных видов (например, *Artemia franciscana*). Широко используемое в неспециализированной литературе латинское название *A. salina* часто вызывает путаницу, так как оно относится к виду, распространение которого ограничено исключительно средиземноморским бассейном. Тем не менее, так как мы использовали в отдельных экспериментах науплии артемий (рис. 1. 2), полученные из консервированных цист сибирской компании Ar-

temia Wholesale, идентифицирующей свой продукт как *Artemia salina,* далее мы вынуждены употреблять это латинское название.

Рис. 1. 2. Коловратки *B. plicatilis* (слева) и науплии *A. salina* (справа)

Артемия обладает адаптивными механизмами, позволяющими ей выдерживать высокую концентрацию соли до 150 ‰ и концентрацию кислорода до 1 мг·л$^{-1}$ [106]. Это один из наиболее широко используемых кормовых организмов применяемых в аквакультуре. Размножение артемий может быть как партеногенетическим, так и раздельнополым. При партеногенетическом размножении в выводковой камере самок развиваются тонкостенные, бедные желтком яйца. При бисексуальном размножении, после спаривания и оплодотворения, яйца также поступают в выводковые камеры самок. При оптимальных условиях среды развитие эмбрионов протекает непосредственно в камере, и из них вылупляются личинки-науплии. При неблагоприятных условиях среды образуются эмбрионы, покрывающиеся на стадии гаструляции многослойной оболочкой, образуя цисты. Эти цисты, откладываемые самкой, могут переносить неблагоприятные условия и сохраняться длительное время. Именно они и используются в аквакультуре для выведения науплиев. После высыхания цисты содержат от 6 до 10% влаги, обмен веществ эмбриона не активизируется, и цисты могут длительное время оставаться в покоящейся фазе, что делает их очень удобными для хранения и консервации. После перемещения в благоприят-

ные условия из цист выклевываются науплии. Эти свойства артемий используют в аквакультуре, когда в течение 18-24 час инкубации из цист можно получить большое количество однородных по размеру науплиев, которые, после первой линьки становятся метанауплиями.

При выращивании камбалообразных на ранних стадиях развития артемия также является незаменимым кормом. Науплии и метанауплии артемии вводятся в рацион личинок, постепенно замещая коловраток (рис. 1. 3).

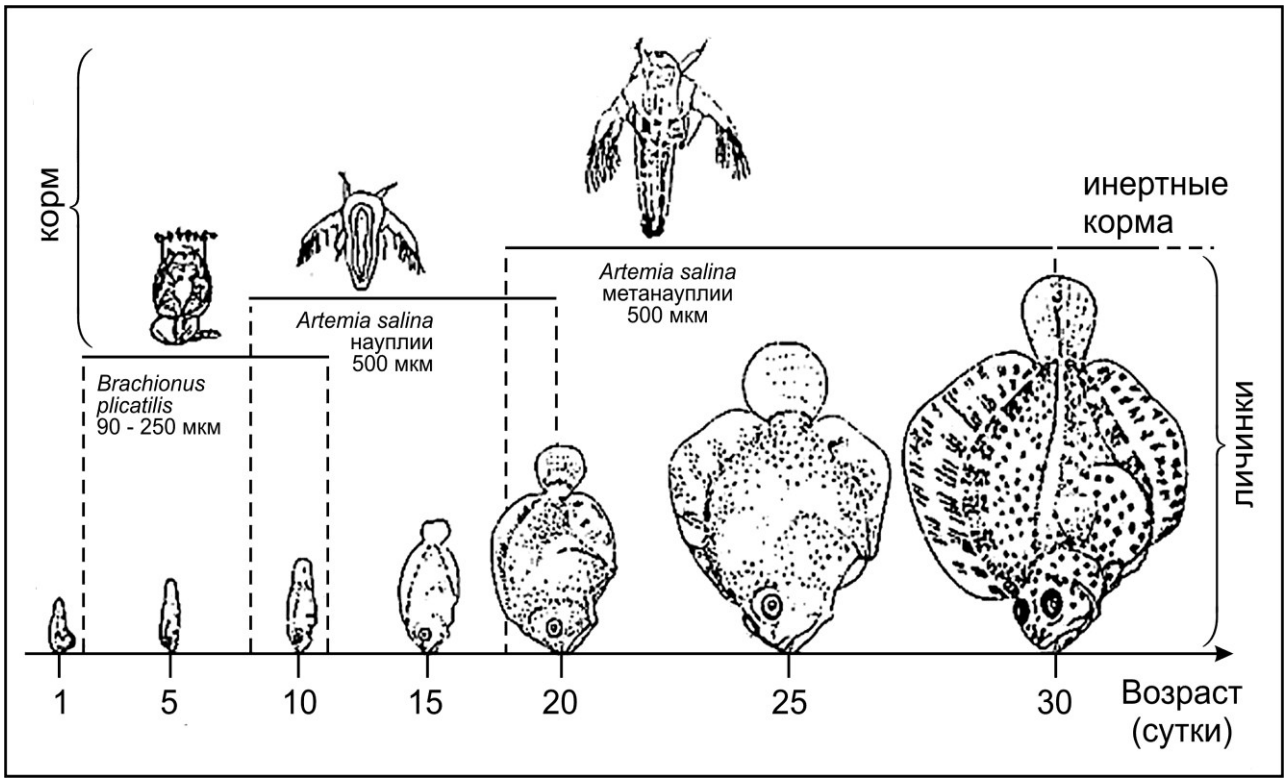


Рис 1. 3. Кормовые организмы камбалы на различных этапах культивирования [152]

Отмечено, что при переходе личинок на питание науплиями артемий их суточный прирост массы тела значительно возрастает по сравнению с этапом кормления коловратками [5].

Артемия, как кормовой организм обладает рядом преимуществ, выгодно отличающих его от других видов корма: а) высокая степень ассимиляции пищи – до 50%; б) высокое содержание белка (60 %) [84], незаменимых аминокислот, витаминов, гормонов и каротиноидов; в) мелкие размеры науплиев (430 – 520 мкм) и мяг-

кий наружный скелет. Данный организм технологичен, он обладает способностью к выживанию при высоких плотностях, а абиотические и биотические факторы среды в течение всего цикла культивирования могут оставаться неизменными, что облегчает культивирование данного кормового объекта. При выращивании калкана кроме науплиальной стадии артемии используют и метанауплиальные стадии (рис. 1. 3).

Метанауплии имеют более крупные размеры (600 –800 мкм), их вводят в рацион личинок калкана на более поздних стадиях их развития с 12-14 сут, и используют до момента перевода личинок на инертные корма (25-30 сут) в зависимости от технологии, температуры и темпов роста личинок (рис. 1. 3). Непосредственно перед скармливанием метанауплиев личинкам данный кормовой организм насыщают микроводорослями, витаминами, лекарственными препаратами и др., т.е. он выполняет транспортную функцию.

1. 4. Критические аспекты культивирования камбалообразных на примере атлантического тюрбо и черноморского калкана

Несмотря на ряд успешных биотехнологических разработок в области искусственного разведения как тюрбо, так и калкана, существует ряд проблем, которые ограничивают производство данных видов и требуют разработки качественно новых методов культивирования (рис. 1. 4).

Основными «узкими местами» выращивания камбалообразных являются трофический и микробиологический аспекты культивирования, как самих личинок, так и их кормовых организмов (рис. 1. 4). Продолжает оставаться высокой смертность молоди тюрбо и калкана при зарыблении естественных водоемов. Отсутствует методика адаптации искусственно выращенной молоди к естественным условиям обитания перед выпуском в прибрежные акватории, которая могла бы повысить процент выживаемости выпущенных рыб.

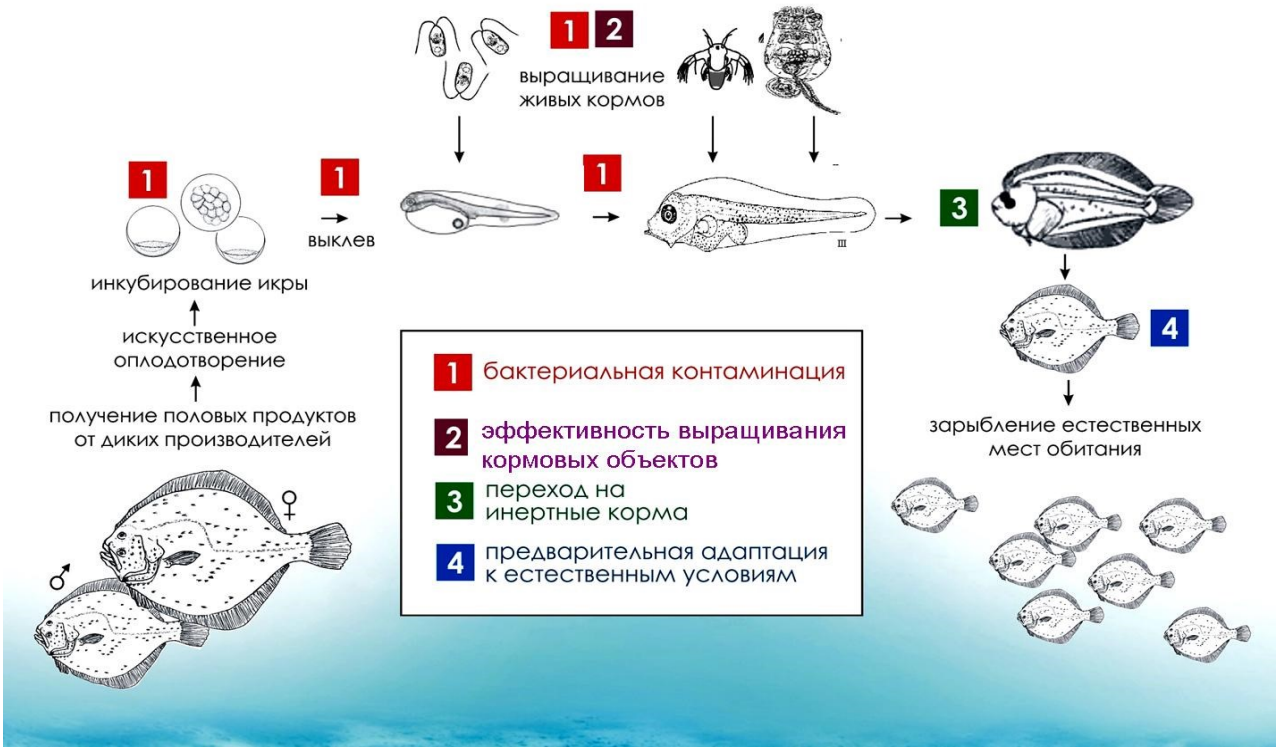


Рис. 1. 4. Основные проблемные этапы в системе искусственного выращивания камбалообразных

1.4.1. Проблемы эффективности выращивания коловраток *Brachionus plicatilis*. Для каждого кормового организма (КО) характерны свои условия культивирования, соответствующие их биологическим параметрам. Выращивание и содержание КО – трудоемкий процесс, требующий материальных и временных затрат. Низкая продуктивность кормовых организмов, обусловленная несовершенством методик культивирования, может значительно снизить рентабельность производства рыб. Несмотря на многолетние исследования в этой области и множество существующих методик выращивания КО, проблема оптимизации их культивирования остается актуальной, в частности постоянно модифицируются методики культивирования коловраток. В условиях пилотного выращивания в ИнБЮМ используются только накопительные методы культивирования беспозвоночных в связи с отсутствием дорогостоящего оборудования, необходимого для проточного культивирования. Кроме того,

накопительное культивирование обеспечивает наименее контаминированную продукцию живых кормов. Поэтому далее мы рассматриваем именно накопительные культуры коловраток.

Существующие технологии накопительного культивирования *B. plicatilis* [51, 76, 95] требуют повышения их продуктивности за счёт оптимизации параметров массового культивирования. Оптимизировать методики выращивания коловраток можно за счёт изменения целого ряда факторов культивирования, основным из которых является трофический. В аквакультуре для насыщения *B. plicatilis* часто используют искусственные питательные смеси (SELCO) [11, 51], однако наилучшим кормом для получения качественной продукции коловраток остаются микроводоросли. Видовой состав микроводорослей, которыми могут питаться коловратки широк. Виды микроводорослей, а также методика насыщения *B. plicatilis* (температура, плотность организмов) в значительной степени определяют продукционные показатели животных [124, 148]. Известно, что коловратки обладают способностью к избирательному питанию. На селективность питания может влиять размер, биохимический состав клеток микроводорослей и привыкание к какому-либо виду корма.

Таким образом, для оптимизации выращивания коловраток - важнейшего звена биотехнологической схемы культивирования камбалообразных, необходимо учитывать наиболее важные биотические факторы, влияющие на развитие культуры данного организма, подбирать оптимальные виды микроводорослей, при питании которыми продукционные показатели коловраток будут максимальными. Анализ научно-исследовательских работ и получение новых данных по продукционным показателям коловраток при питании различными видами микроводорослей, а также исследование влияния предварительной трофической адаптации *B. plicatilis* к различным видам микроводорослей на селективность их питания позволит оптимизировать существующие методики культивирования коловраток.

1.4.2. Микробиологические проблемы культивирования личинок тюрбо, черноморского калкана и их кормовых организмов. Одна из самых актуальных проблем в технологии выращивания камбалообразных это непредсказуемая массовая смертность личинок на ранних стадиях развития, обусловленная вспышками бактериальных инфекций. Высокая численность бактерий является результатом интенсивных технологий культивирования личинок рыб и их КО, предполагающих высокую плотность посадки организмов. В результате происходит насыщение среды выращивания личинок (СВЛ) большим количеством метаболитов, являющихся субстратом для роста бактерий, и как следствие, нарушение взаимоотношений между рыбой и ассоциированной с ней микрофлорой, характерных для естественной морской среды [44]. Пролиферация оппортунистических бактерий в СВЛ приводит к стрессированию культивируемых организмов [58], и, как следствие, возникновению у них инфекционных заболеваний, приводящих к повышенной смертности [74] .

К условно патогенной микрофлоре, вызывающей вспышки инфекционных заболеваний камбалообразных при искусственном выращивании, относят микроорганизмы родов *Aeromonas, Pseudomonas* и *Vibrio* [90, 144]. Вспышки численности этих патогенов являются причиной огромных потерь в питомниках [44].

Источники бактериальных инфекций. Источниками бактериальных контаминаций СВЛ могут являться некачественно подготовленная вода, используемая в выростной системе, инфицированная икра, и т.д. [44]. Однако основным вектором передачи патогенных бактерий личинкам рыб являются их КО [27, 116, 121]. Переход личинок на экзогенное питание КО - самый проблемный в отношении бактериальных инфекций этап культивирования камбалообразных вообще и калкана в частности. На этом этапе иммунная система личинок практически не развита, и они подвержены инфекционным заболеваниям. Начало питания инициирует колонизацию кишечника личинок микрофлорой, ассоциированной с живыми кормами. В её состав часто входят представители условно патогенной микрофлоры

грамотрицательные ферментативные бактерии родов *Vibrio* (до 60 %), *Pseudomonas, Aeromonas* и т.д. [44, 144] – основные возбудители инфекционных заболеваний рыб.

Коловратки - наиболее проблематичный в отношении бактериальных контаминаций кормовой объект. В стареющей культуре при снижении концентрации пищи (микроводоросли) в среде, коловратки могут изменять пищевое предпочтение от крупной фракции (микроводоросли) к более мелкой (бактерии) [44, 143], при этом численность гетеротрофных бактерий в их пищеварительном тракте резко возрастает [73]. Потребление таких коловраток вызывает у личинок дисфункцию органов пищеварительной системы. Попадая вместе с коловратками в пищеварительный тракт личинок, бактерии содержащиеся в кишечнике *B.plicatilis* и колонизирующие их покровы, вырабатывают токсины и другие вещества, которые нарушают транзит и ассимиляцию пищи в кишечнике личинок [117]. Высокое содержание бактерий в коловратках может привести к полной остановке питания личинок данным видом корма [44, 140].

Артемия. Науплии и метанауплии артемий также один из основных источников передачи патогенных бактерий личинкам [80]. Микробиологическими исследованиями установлено, что на поверхности цист в альвеолярных и кортикальных слоях их внешней оболочки локализуется значительное число бактерий [56], которые не всегда элиминируются дезинфицирующими средствами [72]. Большое количество органических веществ, накапливаемое в среде и обусловленное выходом науплиев из цист, а также температурный диапазон, необходимый для выклева науплиев (25-30 ºС), создают благоприятные условия для развития внесенной в среду вместе с цистами артемии микрофлоры, в состав которой часто входят опасные патогены группы *Vibrio sp*. [111, 141]. Перевод личинок на питание артемиями, особенно метанауплиями, насыщенными искусственными смесями, часто коррелирует со вспышками смертности личинок, связанными с возрастанием численности патогенов.

Икра. В ряде исследовательских работ было выявлено, что низкие показатели выживаемости, роста и качества, искусственно выращиваемых личинок могут быть связаны с микробиальными условиями в период эмбрионального развития рыб

[137]. При искусственном выращивании морских рыб икру инкубируют при плотности посадки, значительно превышающей таковую в природе, что определяет её неспецифические взаимоотношения с бактериями. Условно патогенные бактерии, которые входят в состав нормальной микрофлоры организмов, в условиях искусственного выращивания при нарушении микробиологического баланса могут становиться патогенными. Колонизация поверхности икры бактериями происходит в течение нескольких часов после оплодотворения [92]. Микрофлора, которая развивается на поверхности икры, отражает её состав и численность в среде инкубации. В дальнейшем она формирует эпифлору икринки. Протеолитические ферменты, которые вырабатывают некоторые бактерии, входящие в состав эпифлоры искусственно выращиваемых рыб, могут негативно влиять на развитие эмбриона [92].

До настоящего времени проблема бактериальных контаминаций среды инкубации икры (СИИ), СВЛ и их КО остается основным нерешенным вопросом при искусственном выращивании камбалообразных. Поэтому одной из важнейших задач данного сектора аквакультуры является разработка методов регулирования численности и состава микрофлоры в средах инкубации икры, выращивания личинок и их кормовых организмов.

Пути решения микробиологических проблем. Решение микробиологических проблем при выращивании морских рыб на ранних этапах развития сконцентрировано на нескольких направлениях: 1) неселективное снижение общей численности гетеротрофов (применение дезинфекции и антибиотиков); 2) повышение числа селективных, позитивно влияющих на личинок и водную среду, бактерий (техника «зеленой воды); 3) внесение пробиотических бактерий в среду выращивания и 4) повышение резистентности личинок к бактериальным инфекциям (иммуностимуляция личинок и вакцинация мальков) [44].

Антибиотики на сегодняшний день широко используются практически всеми аквакультурными хозяйствами, т.к. они быстро и эффективно снижают общий уровень гетеротрофов, и, в частности, патогенов [116, 140]. К антимикробным препаратам, которые вносят как непосредственно в среду выращивания рыб, так и через живые и инертные корма, насыщенные ими, относятся ампициллин, амоксиллин, нео-

мицин, канамицин, сульфаниламиды и т.д. [44]. В 90-е годы многие коммерческие питомники использовали антибиотики в профилактических целях. Только Норвегия, производящая наибольшее количество аквакультурной продукции, расходовала около 50 т антибиотиков в год [102]. Такое активное, неконтролируемое применение антибиотиков спровоцировало появление резистентных к ним штаммов бактерий, привело к подавлению роста не только патогенной, но и естественной кишечной микрофлоры личинок, способствующей нормальному усвоению питательных веществ и отвечающей за состояние иммунной системы [44]. Результатом этого стало снижение аквакультурной продукции [52, 100]. Кроме того, негативным последствием применения антибиотиков является их отрицательное воздействие на здоровье людей, употребляющих в пищу рыбную продукцию, подверженную антибиотической обработке [94]. Так, хлорамфеникол – синтетический антибиотик широкого спектра действия, накапливаясь в организме рыб, попадает по пищевой цепи в организм человека, и даже при низких концентрациях может оказывать токсичное и канцерогенное действие [108]. Установлено, что этот антибиотик может вызвать у человека ряд патологий, в частности такое серьезное заболевание кровеносной системы как апластическая анемия [108]. Несмотря на это, почти все развивающиеся страны, где сегодня сосредоточено большее число аквакультурных хозяйств, активно используют хлорамфеникол.

Все перечисленные негативные аспекты применения антибиотиков обусловливают необходимость поиска альтернативных решений проблемы бактериальных контаминаций СИИ, СВЛ и их КО. Большое внимание в данном вопросе уделяют физическим методам борьбы (озонирование, УФ облучение). Одним из альтернативных методов также рассматривается применение микроводорослей с антимикробным эффектом [149].

Применение озона. Чаще всего, озон используют для снижения численности бактерий в СИИ. Его бактерицидное действие обусловлено тем, что, во-первых, он непосредственно разрушает оболочку бактерий, и, во-вторых, попадая в морскую воду, он образует с её компонентами окисляющие соединения. Так, например, при вступлении озона в реакцию с бромом – компонентом морской воды, образуется ги-

побромид - мощная дезинфицирующая субстанция. Однако эти окислители могут также вступать в реакцию с оболочкой икры – хорионом, изменяя его функциональные свойства [93]. Тем не менее, применение озона в правильно подобранных дозах часто дает положительный результат в борьбе с бактериальными инфекциями [93].

Микроводоросли как альтернатива применению антибиотиков. В природе микроводоросли обитают в богатых микроорганизмами средах и вынуждены конкурировать с бактериями за ограниченное пространство и ресурсы [101]. С этим связана способность некоторых видов микроводорослей к синтезу антибиотиков и хорошо выраженному ингибированию бактериального роста [1]. Подобный эффект может проявляться и на экосистемном уровне, когда, например, массовое развитие фитопланктона ведёт к снижению численности гетеротрофных бактерий в толще воды [26].

Внесение морских микроводорослей непосредственно в выростные марикультурные системы (технология «зелёной воды») повышает выживаемость и рост личинок [96]. Предполагают, что положительный эффект "зелёной воды", помимо повышения качества кормовых организмов, обусловлен антибактериальными и иммуностимулирующими характеристиками микроводорослей [131], а также пробиотическим воздействием ассоциированной с ними микрофлоры.

Важно также отметить, что некоторые морские микроводоросли продуцируют антимикробные соединения, которые устойчивы в солёной среде [127], тогда как эффективность антибиотиков в условиях высокой солености может снижаться.

1.4.3. Проблема подготовки молоди черноморского калкана к выпуску в естественные места обитания. Подрощенная метаморфизированная молодь калкана может быть использована для дальнейшего выращивания до товарных размеров, однако, это технически ёмкий процесс, требующий больших финансовых инвестиций. Длительное недофинансирование научной и практической базы выращивания калкана на побережье Крыма определило невозможность полноценного развития данного сектора аквакультуры в ближайшее время. В большинстве причерноморских государств товарное производство калкана

также не развито вообще или только начинает развиваться (Турция, Румыния). Таким образом, продукция, полученная на камбальных заводах, в ближайшие годы не сможет конкурировать с продукцией рыболовства. При недостатке средств на строительство хозяйств с полным циклом товарного выращивания калкана перспективным направлением является подращивание личинок до полного завершения метаморфоза с их последующим выпуском в прибрежные акватории [13]. Это наиболее реальный путь повышения промыслового запаса калкана в Чёрном море.

Зарыбление акваторий искусственно выращенной молодью рыб сопряжено с определенным экологическим риском. Происходит снижение генетического разнообразия в результате использования ограниченного числа особей для получения половых продуктов, снижение уровня белкового полиморфизма, утрата аллелей и обеднение генофонда и, как результат, снижение уровня генетической изменчивости [6]. Это отрицательно отражается на генетическом популяционном гомеостазе, т. е. на наборе генетически обусловленных реакций, обеспечивающих устойчивость развития организма в меняющихся условиях среды. Поэтому уменьшение генетической гетерогенности становится серьезным фактором риска для популяции и для вида [6]. В отношении калкана этот риск нивелируется благодаря гидрологическим условиям Чёрного моря, а также планктонным фазам развития личинок [36], обеспечивающим дрейф генов.

Данных о выживаемости выпущенных мальков камбалообразных очень мало. Экспериментальные выпуски камбалы тюрбо, близкородственного калкану вида, в прибрежные воды производили в ряде стран. В Дании молодь, выпущенная в прибрежную зону пролива Каттегат, характеризовалась высокими показателями выживаемости [120]. Напротив выживаемость мальков тюрбо, выпущенных в прибрежные воды Испании, была очень низкой [70].

В Украине экспериментальные выпуски культивируемой молоди калкана производили в нескольких участках акваторий Черного моря. Так, сотрудниками лаборатории культивирования камбалы калкан ИнБЮМ неоднократно производился выпуск 2- 4 месячных мальков, выращенных в лабораторных условиях в течение 1990 - 2003 гг. в прибрежные воды Севастополя [128]. За период с 1987 по 2009 гг. керчен-

ским отделением ЮгНИРО совместно с Одесским отделением ЮгНИРО зарегистрирован выпуск 750 тыс. экземпляров выращенных мальков черноморского калкана в Шаболатский лиман [30]. В рамках государственной программы Украины по пополнению рыбных запасов Черного моря, в прибрежную акваторию северо-восточного Крыма в районе мыса Такиль в 2013 г. было выпущено более 1600 мальков черноморского калкана, выращенных на научно-исследовательской базе ЮгНИРО (г. Керчь) [35]. Однако исследования по выживаемости искусственно выращенной молоди калкана в естественных условиях не проводили, поэтому оценить эффективность зарыбления моря искусственно выращенными мальками калкана невозможно. Кроме того, очевидно, что к качеству молоди, предназначенной для зарыбления должны предъявляться иные требования, чем к молоди, для товарного выращивания.

При современных интенсивных методах культивирования молодь камбалообразных питается инертными кормами и содержится в пластиковых бассейнах, поэтому нормы реакции естественного поведения у нее отсутствуют. Неадаптированная молодь в естественных условиях не может полноценно охотиться, маскироваться и легко становится добычей хищников.

Такая ситуация определяет необходимость разработки принципов предварительной адаптации молоди к естественным условиям предполагаемых мест выпуска, что позволит минимизировать потери, неизбежные при смене окружающей среды. Для повышения показателей выживаемости в естественных условиях, молодь должна обладать сформированным пищевым поведением и защитными реакциями. Необходима также адаптация к физическим условиям естественной среды, в том числе к грунту и температуре воды.

Правильно подготовленная к выпуску в естественные акватории молодь калкана может повысить запасы этого вида в Черноморской акватории Крыма в течение нескольких лет без дополнительных затрат на её подращивание до товарной массы. По подсчетам некоторых специалистов [5] при ежегодном выпуске в море 100 тыс. экземпляров молоди калкана объём дополнительного вылова может составить 50-75 т в год, однако, очевидно, что авторы чрезмерно завысили потенциальную выжива-

емость искусственно выращенного калкана в естественных условиях. Эффективность зарыбления территориальных вод молодью калкана теоретически обоснована анализом особенностей биологии этого вида рыб: после завершения метаморфоза и в последующие этапы жизни калкан ведёт донный образ жизни и совершает незначительные по протяжённости миграции [22, 36]. Таким образом, вероятность ухода выпущенных в море особей калкана в территориальные воды сопредельных государств невелика.

Нивелировать все вышеперечисленные недостатки в существующей методике выращивания личинок калкана и их кормовых организмов возможно путем внесения основанных на научных исследованиях позитивных изменений в общепринятые схемы культивирования. Повышение эффективности выращивания кормовых организмов калкана, снижение бактериальных контаминаций в среде инкубации его икры и выращивания личинок, разработка принципов адаптации молоди калкана к выпуску в естественные места обитания, должны базироваться на научно обоснованных подходах. Решение этих проблем позволит оптимизировать биотехнологии культивирования калкана и повысить численность его популяции в Черноморском регионе за счет выпуска жизнестойкой молоди в прибрежные акватории Крыма.

РАЗДЕЛ 2

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2. 1. Объекты исследования

1. Оплодотворённая икра, личинки и подрощенная молодь калкана

2. Кормовые организмы

а) Микроводоросли различного систематического положения (табл. 2.1)

Таблица 2.1

Микроводоросли, используемые в экспериментальных работах

Класс	Вид
Chlorophyceae	*Dunaliella salina* Teod., 1905
Prymnesiophyceae	*Isochrysis galbana* Parke, 1949
Bacillariophyceae	*Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, 1897
Trebouxiophyceae	*Chlorella vulgaris* Beijer., 1890
Prasinophyceae	*Platymonas viridis* Rouch
Bacillariophyceae	*Thalassiosira weissflogii* (Grunow) G. Fryxell et Hasle, 1977

б) Партеногенетический клон коловраток *Brachionus plicatilis* Muller, 1786

в) Каланоидные копеподы *Acartia tonsa* Dana, 1849 (из периодических культур лаборатории культивирования камбалы калкан).

г) Цисты и науплии артемий сибирской расы *Artemia salina* Linnaeus, 1758 (производитель компания Artemia Wholesale) и метанауплии артемий *Artemia franciscana* Kellogg, 1906 GSL (Great Salt Lake, США)

д) Гаммариды *Echinogammarus olivii* Milne-Edwards, 1830, нереис *Nereis diversicolor* Müller, 1776

3. Бактерии, ассоциированные с КО, средой инкубации икры и выращивания личинок.

2. 2. Методы водоподготовки

Для инкубации икры, выращивания личинок, их КО и проведения всех экспериментальных работ использовали подготовленную морскую воду (ПМВ), которую подвергали грубой очистке и отстаиванию в накопительном бассейне. Перед использованием вода из накопительного бассейна проходила последовательную фильтрацию через картриджные фильтры (10, 5 и 1 мкм) и обработку ультрафиолетом (УФ) в системе тонкой очистки и фильтрации (рис. 2. 1)

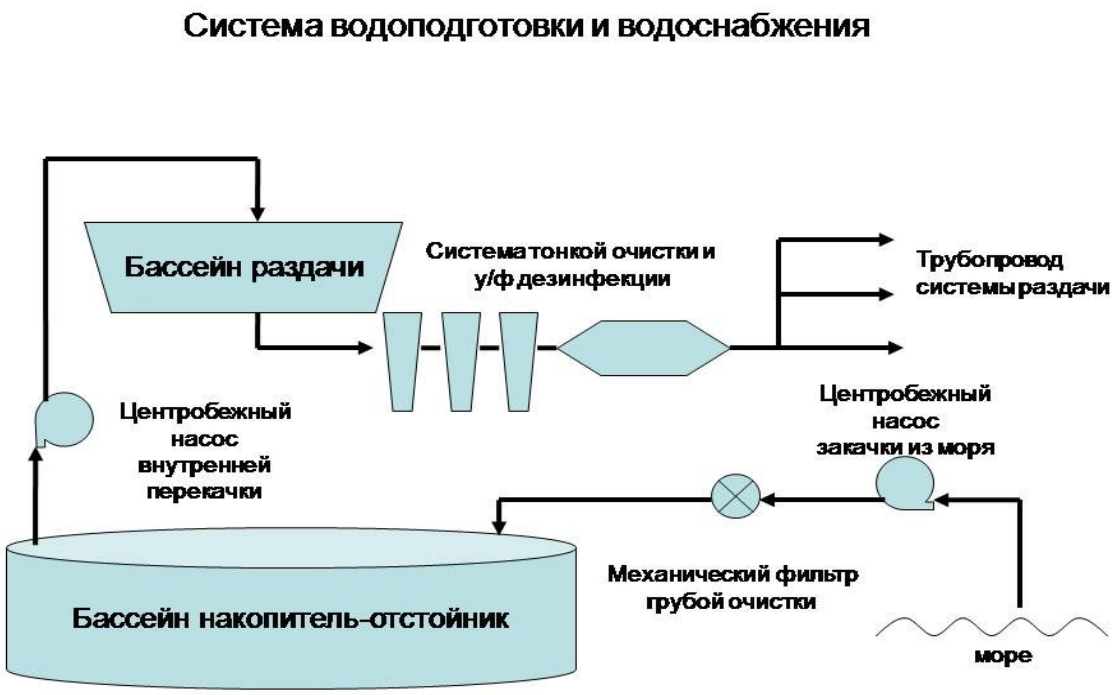


Рис. 2. 1. Схема водоподготовки в системе искусственного выращивания личинок камбалы калкан. Лаборатория культивирования камбалы калкан ИнБЮМ.

Обработанную ультрафильтрацией и ультрафиолетом морскую воду без дополнительной стерилизации использовали для инкубации икры и культивирования личинок. Для выращивания массовых культур микроводорослей и коловраток воду однократно пастеризовали, для маточных культур микроводорослей вода проходила пастеризацию трижды.

2. 3. Методы культивирования живых кормовых организмов

1. Микроводоросли были получены из коллекции маточных культур отдела экологической физиологии водорослей ИнБЮМ НАНУ (г. Севастополь). Культуры, используемые в экспериментальных исследованиях, выращивали в накопительном режиме на среде Уолна [72] при температуре 24±1ºС. Освещение осуществляли круглосуточно с помощью люминесцентных ламп LD – 40. Интенсивность освещения составляла 5 тыс. люкс.

2. Партеногенетический клон коловраток *B. plicatilis* культивировали в накопительном режиме при постоянном освещении и температуре 24±1°С на ПМВ.

3. Цисты артемий инкубировали в ПМВ при температуре 28°С. Концентрация цист артемий составляла 5 г сыр. массы· $л^{-1}$ в соответствии с рекомендациями [131].

2. 4. Методы получения посадочного материала и инкубации икры

Для отбора половых продуктов использовали живых самок калкана с текучей икрой, выловленных в море в период нереста. Лов производили камбальными сетями на глубинах 50 - 90 метров в прибрежных водах Севастополя. Икру собирали на борту плавсредства в отдельные мерные емкости.

Оплодотворение икры спермой производили полусухим методом при температуре не выше 13°С, в отсутствии прямого солнечного света. Соотношение гамет при смешивании половых продуктов составляло ≈ 6000 сперматозоидов на одну икринку, или 0,5 мл спермы на 100 мл зрелой икры.

Инкубацию оплодотворенной икры производили в емкостях с регулируемым температурным и световым режимами, при умеренной аэрации. Плотность посадки икры составляла 1 - 3 тысячи экз.·$л^{-1}$. Температурный режим инкубации икры находился в диапазоне 13 - 15º С.

2. 5. Методы определения динамики численности и размеров организмов, проточная цитометрия

1. Динамику численности зоопланктона (коловратки, артемии, икра) определяли прямым подсчетом с помощью камеры Богорова и бинокуляра [106].

2. Численность и размеры клеток микроводорослей и бактерий определяли цитометрическим методом.

Проточная цитометрия: Цитометрические измерения и анализ проводили с помощью проточного цитометра Cytomics^{TM} FC 500 (Beckman Coulter, США), оборудованного 488 нм однофазным аргоновым лазером, и программного обеспечения CXP (рис. 2. 2).

Рис. 2. 2. Проточный цитометр CytomicsTM FC 500 , Б - микроскоп Nikon Eclipse TS100-F

Общую численность микроводорослей определяли в неокрашенных пробах с помощью гейтинга популяции клеток на 2-параметрических цитограммах прямого светорассеивания (FS) и автофлуоресценции в красной области спектра (FL4, 675 нм) на безразмерных логарифмических шкалах. Численность бактерий определяли в пробах, окрашенных флуоресцентным маркером SYBR Green I (Molecular Probes, США), с помощью гейтинга популяции клеток на 2-параметрических цитограммах прямого светорассеивания (FS) и флуоресценции SYBR Green I в зелёной

области спектра (канал FL1, 525 нм) на безразмерных логарифмических шкалах (рис. 2.3.).

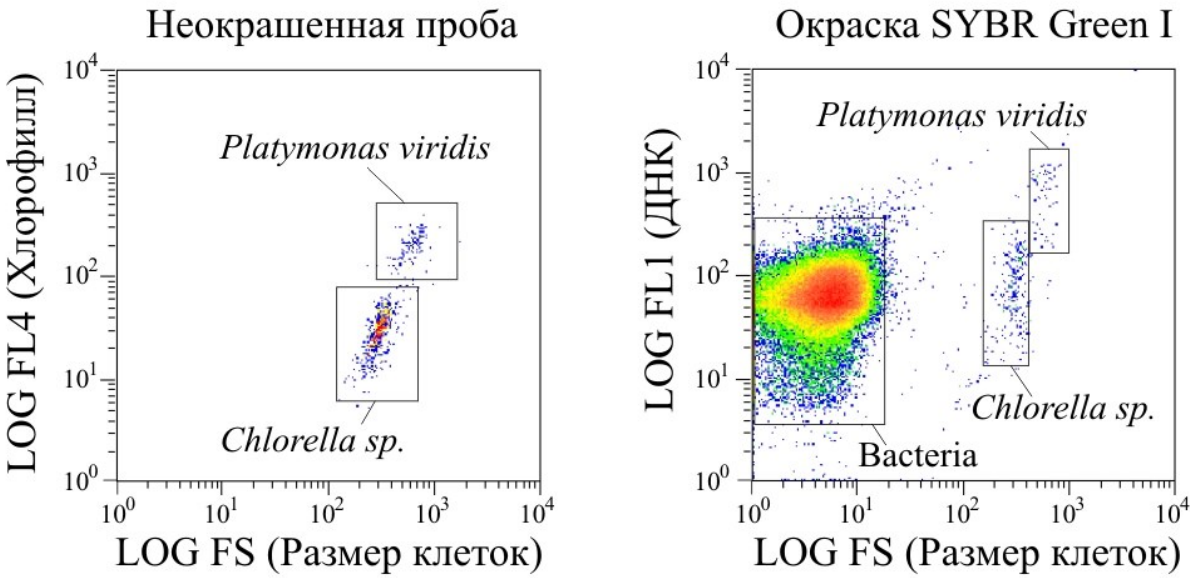


Рис. 2. 3. Типичные цитограммы неокрашенных (слева) и окрашенных SYBR Green I (справа) проб среды выращивания калкана. Показаны кластеры бактерий и отдельных видов микроводорослей.

Окраску бактерий SYBR Green I производили в соответствии с [85]. Это флуорохром повышенной яркости с максимумами возбуждения и эмиссии, соответственно, 497 и 521 нм. Он обладает высоким сродством к двухцепочечной ДНК, но способен также связываться с РНК и одноцепочечной ДНК.

Рабочий раствор красителя готовили в разбавлении 10^{-2} и хранили в замороженном состоянии при –20°С. Конечное разбавление в пробе составляло 10^{-4}. Окраску производили в темноте в течение 30 мин непосредственно перед цитометрическими измерениями.

Концентрацию клеток бактерий и микроводорослей рассчитывали по скорости протока пробы (соответственно 15 и 60 мкл мин$^{-1}$), времени счёта (100-360 с) и количеству клеток, зарегистрированных в этот промежуток времени (в пробах микроводорослей – минимум 3000 кл. для каждой из повторностей). Контроль качества

измерений производили с помощью калибровочных флуоросфер Flow-CheckTM (Beckman Coulter) с известной концентрацией в пробе.

Биомассу микроводорослей (сыр. масса) рассчитывали с учётом размеров их клеток. Калибровку цитометрических данных осуществляли микроскопическим методом, учитывая морфологию клеток каждого из видов микроводорослей [40, 41].

2. 6. Методы проведения экспериментов

2.6.1. Определение продукционных показателей коловраток при их питании микроводорослями разных таксономических групп. В эксперименте использовали коловраток *B. plicatilis*, а также аликвоты из-культур микроводорослей *D. salina*, *I. galbana*, *Ph. tricornutum,* находящихся в экспоненциальной фазе роста.

Коловраток предварительно адаптировали к условиям эксперимента и питанию каждым из видов микроводорослей. Для очищения среды *B. plicatilis* от клеток микроводорослей, которые могли бы повлиять на результат, за 12 ч до начала эксперимента коловраток промыли, сконцентрировали и разбавили их культуру стерильной морской водой.

Подготовленную культуру коловраток поместили в конические колбы, содержащие 200 мл морской воды с добавлением вышеперечисленных видов микроводорослей. Концентрацию клеток микроводорослей разных видов перед экспериментом уравнивали по биомассе путем разбавления исходной культуры стерильной морской водой. Начальная численность коловраток в экспериментальных колбах составляла 25 экз.·мл$^{-1}$, биомассы микроводорослей ≈ 175 мкг сыр. массы·мл$^{-1}$ (табл. 2.2).

Для учёта роста численности клеток микроводорослей в опыте в эксперимент ввели контрольные сосуды с микроводорослями (без коловраток), биомасса которых также была равна (≈ 175 мкг сыр. массы·мл$^{-1}$). Все дальнейшие расчёты проводились с учётом контроля.

Эксперимент проводили в течение 4-х суток. Для оценки численности коловраток, микроводорослей и бактерий в экспериментальных сосудах отбирали пробы

воды каждые 24 ч в трёх повторностях. Численность коловраток определяли прямым подсчётом в камере Богорова, биомассу животных рассчитывали по их размерам (средняя сырая масса особи составляла 3,05 мкг). Для пересчета сырой массы в сухую и в единицы углерода применяли методику [50, 120].

Таблица 2. 2

Начальная численность, объём и биомасса клеток микроводорослей в экспериментальных (с коловратками) и контрольных (без коловраток) сосудах

Вид микроводорослей	Объем клетки (мкм^3 ± дов. инт.)	Численность (тыс. кл·мл$^{-1}$)	Биомасса (мкг сыр.массы· мл$^{-1}$)
D. salina	151,3 ± 7,5	1158,3	175
I. galbana	48,5 ± 3,3	3606,58	175
Ph. tricornutum	27,2 ± 0,2	6623,02	180

Численность микроводорослей и бактерий, а также размеры клеток микроводорослей определяли цитометрическим методом (см. пункт 2.5). Биомассу микроводорослей (сыр. масса) рассчитывали по их размерам. Цитометрические данные калибровали микроскопическим методом, учитывая морфологию клеток каждого из видов микроводорослей [40, 41].

В ходе эксперимента был проведён сравнительный анализ основных продукционных показателей коловраток, таких как прирост численности, скорость фильтрации, рацион, удельная скорость и валовая эффективность роста (K_1) при питании каждым из видов микроводорослей, а также была исследована динамика численности бактерий в опыте (среда с коловратками) и в контроле (в отсутствии коловраток) в зависимости от вида микроводорослей.

В основу расчётов индивидуального рациона коловраток (*G*, мкг сыр. массы·экз$^{-1}$·час.$^{-1}$) и скорости фильтрации ими микроводорослей (*F*, мкл·экз.$^{-1}$·час. ^{1})

(иными словами, скорости осветления среды – clearance rate) были положены следующие формулы [89]:

$$F = \frac{V}{n} \times \frac{\ln C_t^к - \ln C_t^э}{\Delta t}, \quad G = F \times \frac{C_t^э - C_o}{\ln C_t^э - \ln C_o},$$

где V – объём среды в сосуде (мл); n – число коловраток в сосуде (экз.); C_o – начальная численностьмикроводорослей в контроле и эксперименте (кл·мл$^{-1}$); $C_t^к$ и $C_t^э$ – конечная численность микроводорослей, соответственно, в контроле и эксперименте, Δt – продолжительность эксперимента (ч).

Эта схема расчёта учитывает изменения численности (или биомассы) микроводорослей в контрольных сосудах, однако она применима только в том случае, если начальные численности микроводорослей одинаковы в контрольных и экспериментальных сосудах. Если же ставится задача исследования динамики изменений G и F во времени, которая предполагает проведение серии измерений, это условие невыполнимо для всех исследуемых промежутков времени, начиная со второго (из-за расхождения кривых роста микроводорослей в контроле и эксперименте). Поэтому мы модифицировали приведенные выше формулы, включив в них обе начальные численности микроводорослей – в контроле и эксперименте, и введя расчёт средней численности выедателей для случаев, когда она меняется на протяжении эксперимента. Универсальная схема расчёта G и F, использованная в данной работе, выглядит следующим образом:

$$F = \frac{1}{N_{av}} \times \frac{\ln C' - \ln C_t^э}{\Delta t}, \qquad N_{av} = \frac{N_t - N_o}{\ln N_t - \ln N_o}, \qquad C' = C_t^к + C_o^э - C_o^к, \qquad G = F \times \frac{C_t^э - C_o^э}{\ln C_t^э - \ln C_o^э},$$

где N_{av}, $C_o^э$ и $C_t^э$ – средняя, начальная и конечная численности (или биомассы) микроводорослей в эксперименте (кл·мл$^{-1}$ или мкг сыр. массы·мл$^{-1}$); $C_o^к$ и $C_t^к$ – начальная и конечная численности микроводорослей в контроле; N_o и N_t – начальная и конечная численности коловраток (экз.·мл$^{-1}$) в каждом из исследуемых временных интер-

валов. Скорость фильтрации рассчитывали по численностям микроводорослей, рацион – по биомассам.

Удельную скорость роста (μ, сут.$^{-1}$) коловраток рассчитывали по формуле [17]:

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_o}{\Delta t}.$$

Индивидуальную (в расчёте на одну особь) продукцию (P, мкг сыр. массы·экз$^{-1}$·час.$^{-1}$) коловраток определяли, как отношение прироста их общей биомассы к средней численности за этот же период времени по формуле:

$$P = \frac{1}{N_{av}} \times \frac{B_t - B_o}{\Delta t},$$

где B_t и B_o – начальная и конечная биомассы коловраток.

Общую биомассу (мг сыр. массы) рассчитывали по средним размерам организмов и их численности.

Валовую эффективность роста культуры (K_1, %) коловраток определяли, как отношение индивидуальной продукции P к рациону G [17].

2.6.2. Изучение влияния пищевой адаптации на видовую и размерную селективность питания коловраток. В работе использовали партеногенетический клон коловраток *B. plicatilis,* а также 3 вида микроводорослей: *D. salina*, *I. galbana*, *Ph. tricornutum.* Животных разделили на три адаптационные группы, каждую из которых кормили *ad libitum* одним из видов микроводорослей – *D. salina* (группа D), *I. galbana* (группа I) или *Ph. tricornutum* (группа Ph), в течение двух недель. Перед экспериментом в течение суток коловраток содержали без пищи в той же среде, после чего животных из каждой группы помещали в смесь указанных выше микроводорослей. Численность клеток каждого из видов в смеси была одинакова (0,6 · 10^6 кл·мл$^{-1}$). На момент приготовления смеси все водоросли находились в экспоненциальной фазе роста. Численность коловраток в сосудах со-

ставляла 50 экз·мл$^{-1}$. Динамику численности клеток микроводорослей в течение 7 часов эксперимента исследовали методом проточной цитометрии, пробы отбирали каждые 2 часа.

2.6.3. Определение влияния химических антибактериальных средств (хлорамфеникола) на динамику численности бактерий в среде выращивания *Isochrysis galbana* и *Brachionus plicatilis*. В экспериментах использовали неаксеничную культуру микроводорослей *I. galbana* в экспоненциальной фазе роста (≈ 4 ·10^{6} кл·мл$^{-1}$), а также партеногенетический клон коловраток *B. plicatilis*, адаптированных к питанию *I. galbana.*

Для обработки микроводорослей использовали хлорамфеникол (левомицетин) – синтетический антибиотик широкого спектра действия, растворенный в стерильной морской воде. Работа состояла из серии экспериментов:

В **эксперименте 1 (а)** определяли влияние хлорамфеникола в концентрациях 0 (контроль), 5, 10, 50 и 500 мг·л$^{-1}$ на физиологическое состояние и динамику численности клеток микроводорослей в культуре *I. galbana*, а также на динамику численности ассоциированных с ними бактерий при экспонировании 6 сут. Диапазон концентраций антибиотика охватывал все известные дозировки, применяемые в практической аквакультуре и экспериментальных исследованиях [81, 142]. Эксперимент проводили в трёх повторностях в колбах объёмом 500 мл, содержащих 200 мл культуры *I. galbana*. Начальная численность клеток *I. galbana* во всех сосудах была одинакова и составляла около 4 ·10^{6} кл·мл$^{-1}$.

Численность клеток микроводорослей и бактерий определяли методом проточной цитометрии (см. пункт 2.5). На цитограммах выделяли 2 кластера клеток – с высоким (жизнеспособные клетки) и низким (мёртвые и погибающие клетки) внутриклеточным содержанием хлорофилла – далее именуемые, соответственно, ВСХ и НСХ (рис. 2. 4). Пробы отбирали в начале эксперимента и через каждые 24 ч.

В **эксперименте 2 (а)** в течение трёх суток сравнивали прирост коловраток при их питании необработанной (контроль) и обработанной (5 мг·л$^{-1}$ в течение 24 ч) хлорамфениколом культурой *I. galbana* и исследовали динамику численности бакте-

рий в их среде. Эксперимент проводили в трех повторностях в 500-мл колбах, содержащих 200 мл среды с коловратками и микроводорослями. Начальная численностьколовраток во всех сосудах была одинакова и составляла, соответственно, 50 экз.·л$^{-1}$.

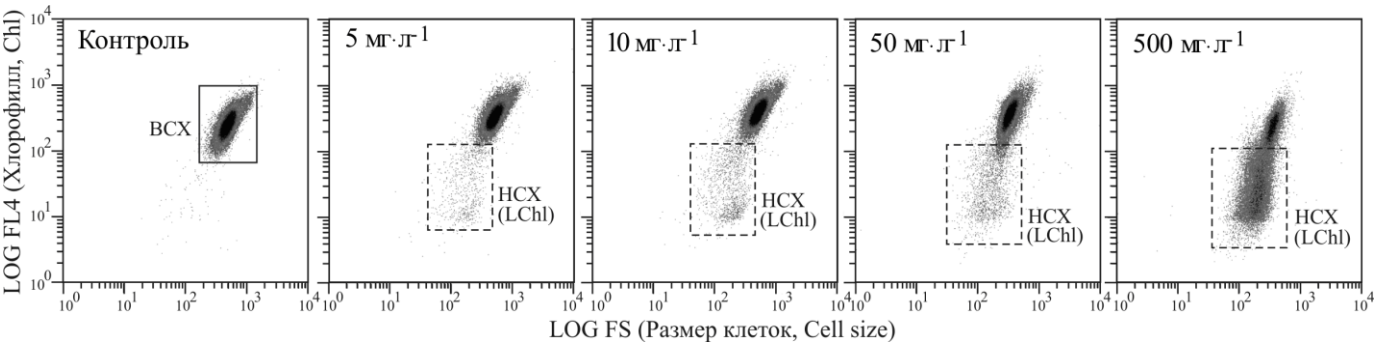


Рис. 2. 4. Цитограммы культур микроводорослей *I. galbana* в последний день эксперимента 1. Указаны концентрации хлорамфеникола и кластеры, соответствующие клеткам с высоким (ВСХ) и низким содержанием хлорофилла (НСХ)

Для подсчета организмов пробы отбирали в начале эксперимента и через каждые 24 ч. Численность коловраток определяли прямым подсчетом в камере Богорова, численность микроводорослей и бактерий – методом проточной цитометрии.

2.6.4. Исследование влияния микроводорослей и их фильтратов на рост бактериальной микрофлоры в средах инкубации икры черноморского калкана и выращивания его личинок В экспериментах использовали оплодотворённую икру и личинок калкана на стадиях эндо- и экзогенного питания, полученных от диких производителей (отловленных в апреле 2010 г. на шельфе Севастопольского района). Для оценки влияния микроводорослей на микрофлору среды выращивания икры и личинок калкана использовали аликвоты культур микроводорослей: *Ch. vulgaris D. salina*, *P. viridis*, *I. galbana, T. weissflogii,* находящихся в экспоненциальной фазе роста, а также их фильтраты, приготовленные с помощью расходных материалов (47-мм нитроцеллюлозные мембраны с диаметром пор 0,2 мкм) и фильтровального оборудования Sartorius (Германия).

Динамику численности микроводорослей и бактерий в экспериментальных сосудах определяли методом проточной цитометрии. Пробы воды объёмом 1 мл из экспериментальных сосудов отбирали в начале эксперимента и через каждые 24 ч, фиксировали их фильтрованным (<0.2 мкм) формальдегидом (конечная концентрация 2%). Температура воды во всех экспериментах составляла 16±1°С. Работа состояла из серии экспериментов, которые охватывали различные стадии развития личинок калкана.

Эксперимент 1 (б) (стадия эмбрионального развития личинок калкана – инкубация икры). В эксперименте определяли влияние смеси микроводорослей *Ch. vulgaris* и *P.viridis* (при концентрациях соответственно 18 и $5 \cdot 10^5$ кл·мл$^{-1}$, т.е. в соотношении около 4:1) на численность бактерий в среде с развивающейся икрой калкана. Предпочтение было отдано смешанной культуре в связи с тем, что, эффективность роста отдельных видов в подобных устойчивых ассоциациях выше, чем в монокультурах [43]. Соответственно, можно ожидать и более выраженного антибактериального действия этих смесей. Кроме того, интересно было выяснить, как изменится баланс в соотношении видов микроводорослей в ходе эксперимента.

Перед экспериментом оплодотворенную икру на стадии бластулы промывали подготовленной морской водой и помещали в экспериментальные сосуды с 500 мл (опыт) и 505 мл (контроль) ПМВ. В экспериментальные сосуды с икрой добавляли 5 мл смеси микроводорослей *Ch. vulgaris* и *P.viridis*. Численность икры в полученных средах составляла около 500 экз.·л$^{-1}$. Опыт проводили в трёх повторностях (табл. 2.3). В ходе эксперимента смену воды и удаление отхода икры в сосудах не производили, т.к. это могло непредсказуемым образом повлиять на динамику микроорганизмов в среде и нарушить идентичность условий.

Эксперимент 2 (б) (эндогенно питающиеся личинки калкана). В эксперименте определяли влияние каждой из монокультур микроводорослей – *I. galbana* $20{,}7 \cdot 10^5$ кл·мл$^{-1}$; *Ch. vulgaris* $19{,}3 \cdot 10^5$, *T. weissflogii* $6{,}1 \cdot 10^4$, *P. viridis* $2{,}9 \cdot 10^5$ и *D. salina* ($21{,}9 \pm 3{,}9 \cdot 10^5$), на численность бактерий в среде с личинками калкана на стадии эндогенного питания, т.е. когда питание личинок осуществлялось исключительно за счет запасов желточного мешка. Чтобы выяснить, в какой степени переход

личинок на стадию экзогенного питания может повлиять на динамику численности микрофлоры в среде выращивания, дополнительная проба была отобрана через сутки после открытия рта у личинок.

Таблица 2. 3

Приготовление среды инкубирования икры и выращивания личинок камбалы калкана в трёх экспериментах

	Икра/Личинки (экз.·л$^{-1}$)	Объём СМВ, мл	Микроводоросли (объём, мл)
Эксперимент 1			
Контроль	Икра (500)	505	-
Опыт	то же	500	*Ch. vulgaris* и *P.viridis* (5)
Эксперимент 2			
Контроль	Личинки[1] (40)	505	-
Опыт 1	то же	500	*I. galbana* (5)
Опыт 2	то же	То же	*D. salina* (5)
Опыт 3	то же	То же	*Ch. vulgaris* (5)
Опыт 4	то же	То же	*P.viridis* (5)
Опыт 5	то же	То же	*T. weissflogii* (5)
Эксперимент 3			
Контроль	Личинки[2] (40)	550	-
Опыт 1	то же	500	*I. galbana*[3] (50)
Опыт 2	то же	То же	*Ch. vulgaris*[3] (50)
Опыт 3	то же	То же	*T. weissflogii*[3] (50)

[1]личинки до перехода на экзогенное питание;

[2]самостоятельно питающиеся личинки;

[3]фильтрат культуры (<0,2 мкм)

В эксперименте использовали личинок калкана в возрасте одних суток. Схема приготовления экспериментальных сосудов была той же, что и в эксперименте (табл. 2. 3), но количество опытов увеличилось до пяти в соответствии с числом тестируемых видов микроводорослей. Средняя численность личинок в экспериментальных сосудах составляла 40 экз.·л$^{-1}$. Количество повторностей было уменьшено до двух, чтобы объём работы соответствовал производительности цитометрических измерений.

Эксперимент 3 (б) (экзогенно питающиеся личинки калкана). В эксперименте определяли влияние фильтратов микроводорослей трёх видов – *I. galbana*, *Ch. vulgaris* и *T. weissflogii* (плотности культур соответствуют указанным в эксперименте 2) на численность бактерий в среде с личинками калкана, экзогенно питающимися живым кормом – коловратками *B. plicatilis* (средняя плотность – 5 экз.·мл$^{-1}$). Применение фильтратов культур представляет практический интерес в тех случаях, когда добавление самих микроводорослей невозможно – их внесение в среду выращивания привело бы к активному размножению питающихся ими коловраток, нежелательному изменению биохимического состава и калорийности живого корма, увеличению бактериальной нагрузки.

В эксперименте использовали личинок калкана в возрасте 7 сут. Фильтраты моновидовых культур микроводорослей готовили с помощью нитроцеллюлозных мембран с диаметром пор 0,2 мкм. В экспериментальные сосуды добавляли по 50 мл фильтрата, тогда как в контроле использовали тот же объём ПМВ. Опыт проводили в трёх повторностях.

2.6.5. Изучение эффекта микроводоросли *Chlorella vulgaris* на интенсивность бактериальной колонизации покровов науплиев артемии и динамику численности бактерий в среде их выращивания. В экспериментах использовали неаксеничную культуру хлореллы *Ch. vulgaris* в экспоненциальной фазе роста (≈ 9·10^{7} кл·мл$^{-1}$), а также коммерческий клон сибирской артемии компании Artemia Wholesale - *A. salina*.

Цисты артемий помещали в конические колбы, содержащие 600 мл стерильной морской воды t = 28°C. Концентрация цист артемий составляла 5 мг сыр. массы· $л^{-1}$ в соответствии с рекомендациями [141]. Экспериментальные колбы с цистами разделили на две серии по три повторности. В первую серию добавляли 50 мл стерильной морской воды (контроль), во вторую – 50 мл культуры *Ch. vulgaris.* Начальная концентрация клеток хлореллы в экспериментальных колбах с цистами артемии составляла $0{,}4 \cdot 10^6$ кл·$мл^{-1}$.

В ходе эксперимента был проведён сравнительный анализ динамики выклева науплиев артемии и динамики численности бактерий в среде, в колбах с добавлением (опыт) и без добавления (контроль) *Ch. vulgaris*. Численность науплиев определяли прямым подсчетом в камере Богорова, пробы отбирали через 18, 20 и 25 часов.

Для анализа динамики численности бактерий (контроль и опыт) и микроводорослей (опыт) пробы среды отбирали в экспериментальных ёмкостях в начале эксперимента, через 20 и 25 ч и исследовали с помощью проточного цитометра.

Для определения интенсивности колонизации поверхности артемий пробы отбирали через 25 часов. Количество исследуемых особей в каждой пробе составляло 50 экз. В качестве флуоресцентного маркера бактериальной плёнки на поверхности артемии использовали SYBR Green I. Окраску бактерий SYBR Green I производили в соответствии с [85]. Конечное разбавление в пробе составляло 10^{-4}. Окраску производили в темноте в течение 30 мин непосредственно перед микроскопическим исследованием. Микрофотосъёмку организмов проводили под микроскопом Nikon Eclipse TS100-F, оборудованным камерой Ikegami ICD-848P, в люминесцентном режиме (набор светофильтров для возбуждения в синей области спектра). Измерения цветовых/яркостных характеристик каждого из исследуемых организмов проводили с помощью оригинального программного обеспечения ImageRegionColor v.1.3. под ОС MS Windows [14]. Программа позволяет вручную выделять очертания организма, автоматически осреднять цвет выделенной области снимка, проводит измерения в соответствии с цветовыми моделями HSB (H – цветовой тон, S – насыщенность, B – яркость) и RGB (R – красный, G – зелёный, B – синий) и сводит полученные данные в таблицу, которая экспортируется в MS Excel. Таким образом, для каждой ана-

лизируемой особи получали один набор значений из шести переменных (HSB и RGB), которые служили показателями интенсивности бактериальной колонизации покровов организмов.

2.6.6. Определение динамики численности бактерий в среде инкубации икры и степени бактериальной колонизации её поверхности при различных методах обработки. В эксперименте определяли эффективность различных методов снижения бактериальных контаминаций в среде инкубации икры (СИИ) (озонирование, добавление в среду микроводорослей с бактерицидным эффектом) по следующим показателям:

1. Динамика численности и удельная скорость роста бактерий (μ) в СИИ.
2. Интенсивность бактериальной колонизации (ИБК) поверхности икры
3. Удельная скорость роста бактерий на питательной среде М65 (μ_{M65}), позволяющая оценить вклад оппортунистов в бактериальное сообщество исследуемых СИИ.

При выборе вида микроводорослей руководствовались наличием у них бактерицидного эффекта, выявленного в ранее опубликованных работах [39].

В эксперименте использовали оплодотворенную икру калкана и неаксеничную культуру *Ch. vulgaris*, находящуюся в экспоненциальной фазе роста (≈ $8 \cdot 10^7$ кл·мл $^{-1}$). Для обработки СИИ озоном, использовали водный озонатор Hailea iso 9001:2000 (пр-во Китай).

После оплодотворения икру поместили в подготовленную морскую воду (ПМВ) и затем разделили на 3 партии. Первую партию промыли ПМВ, дополнительно обработанной озоном (60%, 20 мин), вторую и третью ПМВ. Промытую икру поместили в экспериментальные сосуды объемом 500 мл с тремя вариантами подготовленной морской воды. В первом варианте икру поместили в экспериментальные сосуды с ПМВ, обработанной озоном (60% концентрация в течение 10мин) – СИИ (О), во втором – сосуды с ПМВ, с добавлением 5 мл культуры *Ch. vulgaris* – СИИ (Х). Численность клеток хлореллы в экспериментальных сосудах составляла $0{,}2 \cdot 10^6$ кл·мл $^{-1}$. В третьем варианте икру поместили в контрольные сосуды с ПМВ

без обработки озоном и добавления хлореллы – СИИ (К) (рис. 2. 5) Плотность посадки икры в каждом сосуде составляла 1000 экз.·л$^{-1}$

Пробы среды отбирали из экспериментальных ёмкостей в начале эксперимента и через каждые 24 часа вплоть до момента выклева личинок. Динамику численности бактерий и клеток микроводорослей в среде инкубации икры (О), (Х), (К) определяли методом проточной цитометрии (см. пункт 2. 5)

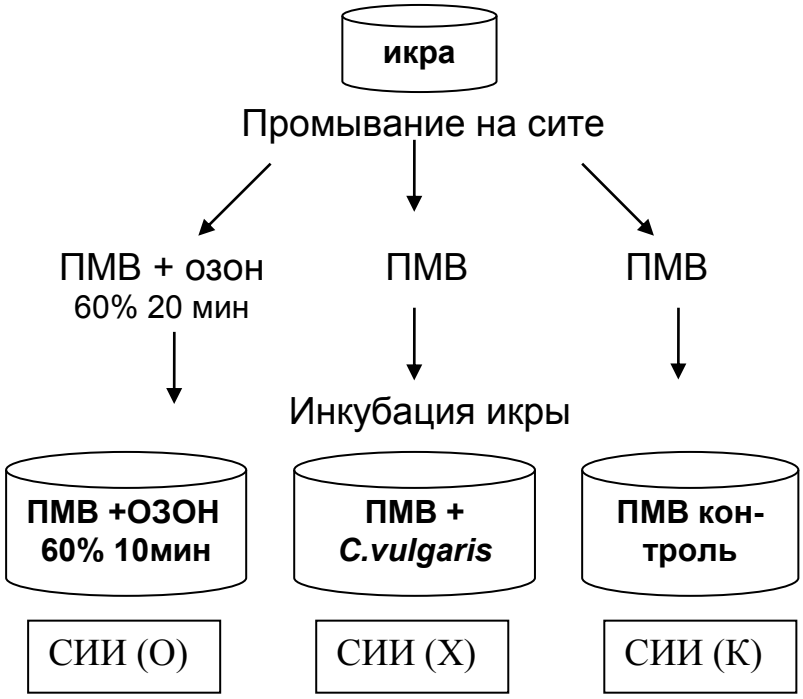


Рис. 2. 5. Схема эксперимента

Примечание: ПМВ-подготовленная морская вода, СИИ - среда инкубации икры

Удельную скорость роста (μ) бактерий в СИИ (О), (Х), (К) рассчитывали по формуле $\mu = \ln (N_t/N_0) / t$, где N_0 и N_t – соответственно, конечная и начальная численности бактерий, t – продолжительность эксперимента.

Интенсивность бактериальной колонизации (ИБК) поверхности икры определяли после её окраски с помощью SYBR Green I. Метод окраски и микрофотосъемки описан выше (см. пункт 2. 6. 5.) Условия съёмки (увеличение, уровень освещения, величина экспозиции и др.) всех экземпляров икры в исследованной выборке были одинаковы, что позволило сравнивать степень обрастания поверхности икринок бактериями по характеру и площади распределения флуоресценции.

Изображения обрабатывали в программе ImageJ 1.45s [68] по единому алгоритму (рис. 2. 6). Маркирование зон яркой флуоресценции SYBR Green I на поверхности икры осуществлялось автоматически с помощью функции Threshold Color (меню Image > Adjust) в цветовой модели HSB (рис. 2. 6). Далее определяли общую площадь выделенных зон в относительных единицах (функция Measure в меню Analyze), величина которой служила показателем ИБК поверхности икры.

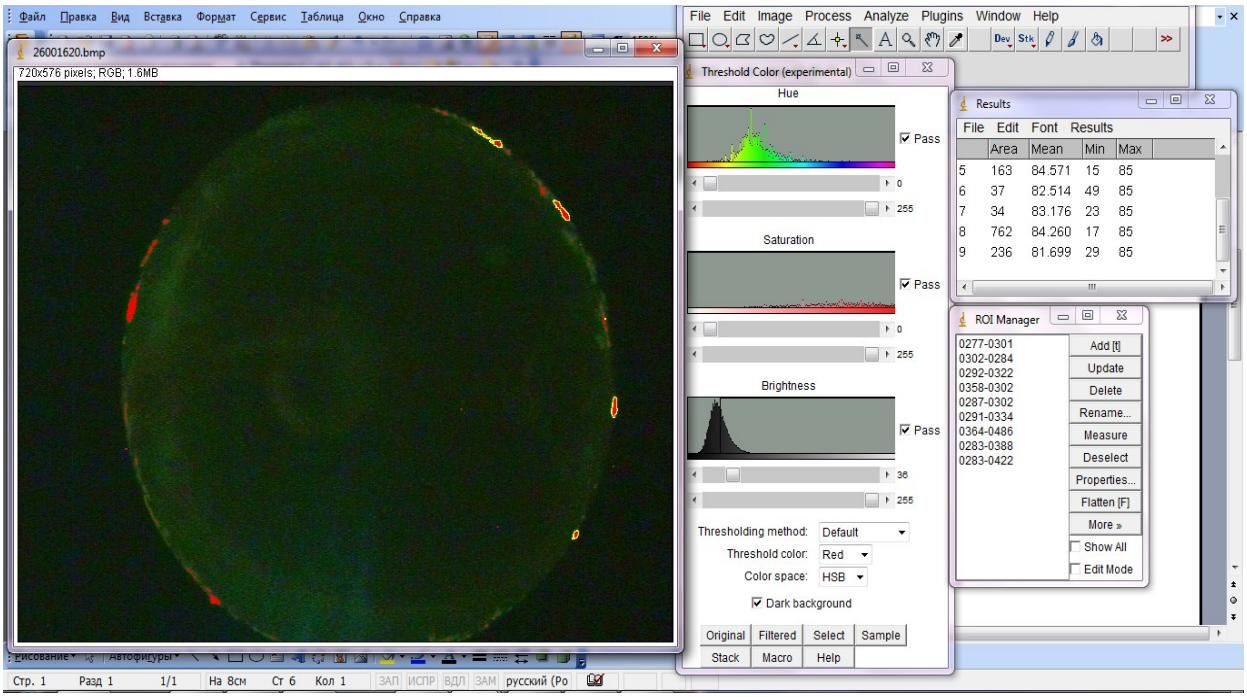


Рис. 2. 6. Оценка интенсивности бактериальной колонизации поверхности икры калкана в программе ImageJ 1.45s по общей площади флуоресценции SYBR Green I. Красным и жёлтым цветами отмаркированы зоны яркой флуоресценции, которые программа выделила автоматически.

Пробы икры отбирали из экспериментальных ёмкостей в начале эксперимента и через каждые 24 часа вплоть до момента выклева личинок. Таким образом, динамику численности бактерий в средах инкубации икры и интенсивность бактериальных колонизаций её поверхности оценивали на трех стадиях развития икры (рис. 2. 7)

Дополнительно в данном эксперименте определяли вклад *r*-стратегов (видов-оппортунистов) в общую бактериальную микрофлору. Этот показатель оценивали в соответствии с методикой [136]. В основу данного метода определения вклада бактерий-оппортунистов был положен постулат о преимущественном росте бактерий r-стратегов на неспециализированных питательных средах [138].

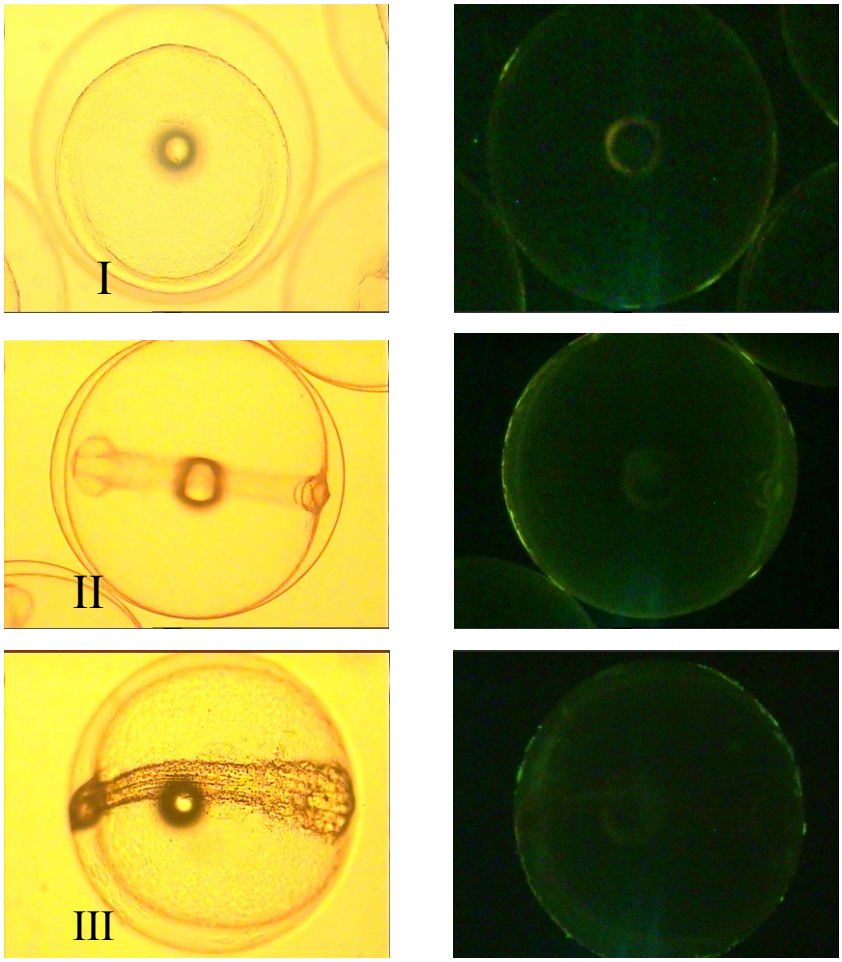


Рис. 2. 7. Икра калкана на стадиях: обрастания (I), сегментации (II), и хвостовой почки (III) в световом (А) и люминесцентном (Б) режиме

Аликвоты пробы (200 мкл) высевали в 3 повторностях в жидкую модифицированную среду М65 (5 мл) [138], приготовленную на стерильной морской воде. Для расчета удельной скорости роста бактерий ($\mu_{M65} = \ln (N_t/N_o) / dt$) определяли их начальную (N_o) и конечную (N_t) численность (суточная экспозиция, dt = 24 ч, при температуре 22 °С) с помощью проточной цитометрии (см. пункт 2. 5).

Метод [138], в котором применялась жидкая питательная среда М65, не рассчитан на точное определение доли *r*-стратегов в общей численности бактерий (как это происходит при высеве на твёрдую питательную среду), но позволяет сравнивать пробы по удельной скорости роста, которая определяется присутствием быстрорастущих видов бактерий. Действительно, оцениваемая в эксперименте величина удельной скорости роста бактерий μ_{M65} пропорциональна (а) доле *r*-стратегов в общей бактериальной численности; (б) удельной скорости роста *r*-стратегов. Это означает, что близкие значения μ_{M65} могли быть получены для проб, в которых доля *r*-стратегов была велика, но темпы их роста – относительно низки, и наоборот, доля *r*-стратегов сравнительно мала, но удельная скорость их роста – высока («агрессивные» *r*-стратеги). В обоих вариантах потенциал негативного воздействия бактерий-оппортунистов одинаков. Таким образом, оцениваемые в эксперименте величины μ_{M65} служили показателем «агрессивности» оппортунистической микрофлоры.

2.6.7. Разработка принципов адаптации и подготовки молоди калкана к выпуску в естественные места обитания. Все эксперименты проводили на мальках черноморского калкана со стандартной длиной тела (SL) 3,5 – 5,0 см (возраст 2,5 – 3,5 мес.), выращенных в питомнике ИнБЮМ по собственной оригинальной технологии из личинок, полученных от «диких» производителей. Работа состояла из серии экспериментов:

Эксперимент 1 (в): Оценка калорийности и усвояемости различных видов корма молодью калкана. В эксперименте использовали одновозрастных и одноразмерных мальков, разделенных на одинаковые группы (в двух повторностях) и предварительно адаптированных к определенному виду корма (табл. 2.4), который давали в течение недели *ad libitum*. Метанауплии артемий получены из консервированных цист GSL (происхождение Great Salt Lake, США), стандартно используемых в аквакультуре камбалообразных. Копеподы получены из переодических культур лаборатории культивирования калкана. Инертные корма (фарш кальмара и ставриды) подбирали, учитывая их доступность, себестоимость и предварительно выявленный интерес молоди калкана к данным видам корма. При выборе живых кормо-

вых организмов, обитающих в прибрежной зоне моря, отдавали предпочтение наиболее доступным (по возможности сбора в необходимом количестве) и соответствующим спектру питания молоди калкана в естественной среде обитания (согласно литературным данным [22, 38]). Нереис и гаммариды были отловлены из естественных мест обитания. Ввиду трудности отлова мелкоразмерного нереиса в необходимом количестве, его крупные экземпляры разрезали на доступные для мальков сегменты длиной 5-7 мм. Гаммарид крупнее данного размера отделяли просеиванием через сито. Копепод выращивали по собственной оригинальной методике полицикличной лабораторной культуры.

Таблица 2. 4

Кормовые объекты, использованные при проведении экспериментов

Кормовые объекты	
применяемые в аквакультуре	**из естественных мест обитания**
Артемии *Artemia franciscana* Кальмар (фарш) Ставрида (фарш)	Гаммариды *Echinogammarus olivii* Копеподы *Acartia tonsa* Нереис *Nereis diversicolor*

Для оценки усвояемости разных кормов определяли их калорийность, а также калорийность фекалий, выделенных после переваривания мальками данного вида корма и собранных в течение суток. Калорийность кормов и фекалий определяли методом мокрого сжигания в модификации А. П. Остапени [25]. Пробы доводили до постоянного сухого веса в сушильном шкафу при температуре 65° С. После высушивания пробы растирали в фарфоровой ступке и делали навески сухого вещества на микроаналитических весах ВЛР-200. Все определения делали минимум в 3 повторностях. Переход к единицам калорийности осуществляли с помощью оксикалорийного коэффициента равного 4,0 кал·мг O_2 [12] Калории рассчитывали на 1 миллиграмм сухого вещества. Усвояемость определяли по процентному отношению разности калорийности корма и калорийности фекалий к калорийности корма.

<u>Эксперимент 2 (в)</u>: **Оценка избирательности гаммарид молодью камбалы калкана.** В экспериментах использовали одновозрастную молодь калкана со стан-

дартной длиной тела (SL) 2,1-3,0 см в возрасте 2,5-3 месяцев, выращенную в искусственных условиях. В трех повторных экспериментах (интервал 4 сут), каждый длительностью 24 часа, оценивали избирательность питания мальков живыми гаммаридами *Echinogammarus olivii*. Гаммарид разделили на 3 размерные группы по длине тела: 4-6 (группа А), 6-8 (группа В), 8-11 мм (группа С). Мальков до и между экспериментами кормили смесью кормов, включающей гаммарид; за сутки до экспериментов выдерживали без корма. Эксперименты на избирательность проводили индивидуально, в емкостях объемом 3 л, задавая исходное количество гаммарид групп А-С в зависимости от размера: А (20-50), В (20-30) и группа С (5-10 экз.). Соотношение размерных групп гаммарид в экспериментах соответствовало таковому в природе. По окончании эксперимента подсчитывали разницу между количеством заданных и оставшихся особей гаммарид разных размерных групп. Избирательность калканом каждой размерной группы гаммарид определяли, используя показатель элективности Е:

$$E= ri-pi/ri+pi,$$

где ri - относительное содержание их в рационе, pi – относительное содержание в исходном комплексе. Избирательность выражается положительными значениями Е (от +1 до –0), отсутствие избирательности Е=0, а значения Е от 0 до –1 - означают избегание кормового организма [18].

<u>Эксперимент 3 (в):</u> Влияние субстрата на поведение искусственно выращенной молоди калкана. Мальков (возраст 2,5 мес.), содержавшихся до эксперимента в стандартных выростных бассейнах без грунта, разделили на две одинаковых группы: одну из них поместили в емкость с предварительно внесенным субстратом, другую – в аналогичные условия без субстрата. В качестве субстрата использовали кварцевый песок, с размером песчинок 0,10 - 0,12 мм. В течение недели адаптации к новым условиям мальков обеих групп кормили по стандартной процедуре гаммаридами и инертным кормом и фиксировали характер их поведения. После адаптации к

новым условиям малькам был предложен незнакомый им корм - мальки атерины *Aterina hepsetus*. Отмечали становление маскировочного поведения калкана, характер охоты, результативность и скорость атак в обеих группах. Повторный эксперимент был проведен через неделю с введением дополнительного нового вида корма, т.е. помимо мальков атерины в экспериментальные емкости были помещены мальки морской иглы *Syngnatus abaster*. Кормовые организмы (мальки атерины и иглы) были заранее выловлены в прибрежной зоне и адаптированы к новым условиям, т.е. их поведение было аналогично естественному (мальки атерины держались стайкой, мальки рыбы иглы пытались замаскироваться).

Эксперимент 4 (в): Определение термопреферендума мальков калкана. Мальков длительное время адаптировали к субстрату и переменному температурному режиму с диапазоном значений от 17 °С до 26 °С. В эксперименте мальков помещали в бассейн длиной 230 см с песком в качестве субстрата, в котором от левого (24 °С) до правого (19°С) края поддерживали разницу температуры воды 5 °С. Мальков ежедневно пересаживали в другую емкость во время чистки бассейна, а затем выпускали в разных участках бассейна. Распределение мальков в зонах с разной температурой фиксировали на протяжении всего светового дня в течение недели.

2. 6. 8. Статистическая обработка, представление результатов. Базовую статистику (средние, 95% доверительные интервалы, стандартные отклонения, парный t-тест) рассчитывали в пакете программы Excel 7.0. Построение графиков – Grapher 2.0.

2. 6. 9. Объём проанализированного материала. Данные были получены в период сезонных работ 2006-2007, 2009-2013 годов. Количество обработанных проб представлено в таблице 2.5.

Таблица 2. 5

Организмы	Общее количество проб	Из них микроскопия и др.	Из них проточная цитометрия
Бактерии	580	150	430
Микроводоросли	570	100	470
Коловратки	230	230	-
Артемии	150	150	-
Икра	270	270	-
Личинки и молодь калкана	250	250	-
Другие	80	-	-
Всего обработано проб	2130		

РАЗДЕЛ 3

ПРОДУКЦИОННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ И СЕЛЕКТИВНОСТЬ ПИТАНИЯ КОЛОВРАТОК *BRACHIONUS PLICATILIS* ПРИ ПИТАНИИ МИКРОВОДОРОСЛЯМИ РАЗНЫХ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ГРУПП

Повышение продукционных показателей коловраток при массовом культивировании может быть достигнуто путем оптимизации различных факторов культивирования, в частности трофического. Наилучшим кормом для получения качественной продукции коловраток являются микроводоросли, видовая принадлежность которых может в значительной степени влиять на воспроизводство животных. Известно, что коловратки обладают способностью к избирательному питанию [66]. Предположительно на селективность их питания может влиять размер, биохимический состав клеток тех или иных микроводорослей, а также привыкание к какому-либо виду корма. Анализ продукционных показателей коловраток при питании различными видами микроводорослей, а также селективности питания *B. plicatilis* позволит оптимизировать методы их массового культивирования.

3. 1. Основные продукционные показатели коловраток при питании микроводорослями разных таксономических групп

В ходе данной работы был проведён сравнительный анализ основных продукционных показателей коловраток, таких как прирост численности, скорость фильтрации, рацион, удельная скорость и валовая эффективность роста (K_1) при питании микроводорослями *D. salina*, *I. galbana Ph. tricornutum*. Также была исследована динамика численности бактерий в опыте (среде с коловратками) и в контроле (в отсутствии коловраток) в зависимости от вида микроводорослей.

Динамика численности коловраток при питании всеми видами микроводорослей в первые сутки эксперимента различалась незначительно (рис. 3. 1). Удельные скорости роста численности коловраток на вторые сутки при питании всеми видами

микроводорослей оказались максимальными за весь период эксперимента (рис. 3. 2). В этот же период наблюдали значительное отставание в росте численности коловраток при питании *I. galbana* по сравнению с другими видами микроводорослей (рис. 3. 1).

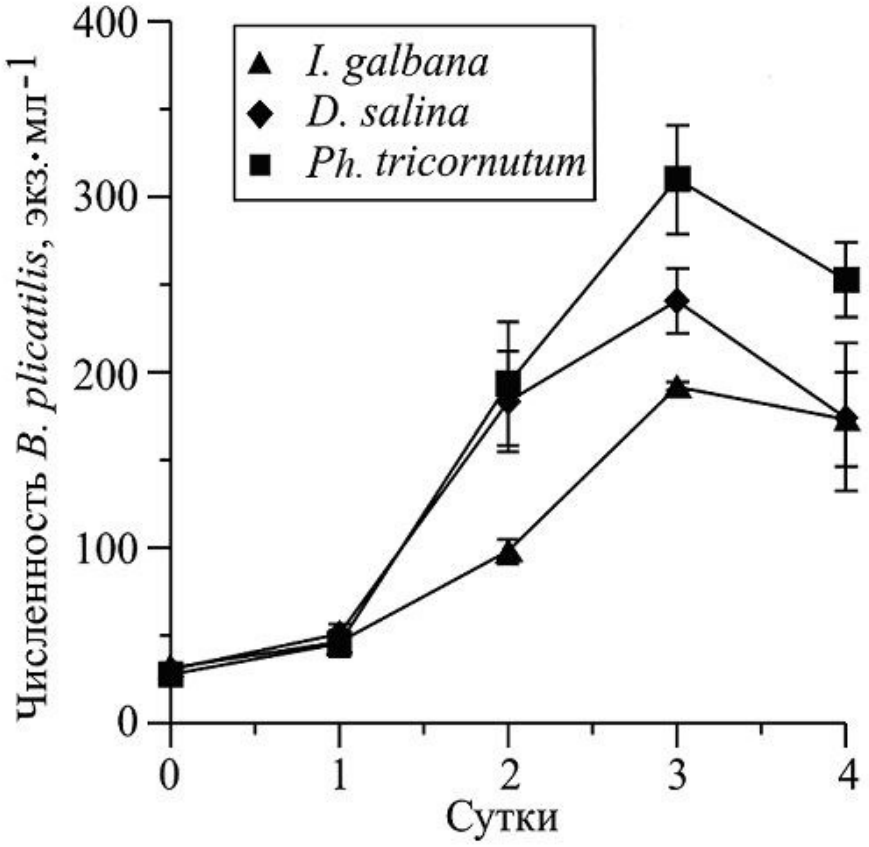


Рис. 3. 1. Динамика численности *B. plicatilis* при питании микроводорослями *D. salina, I. galbana* и *Ph. tricornutum*

В целом, удельные скорости роста численности (μ, сут $^{-1}$) коловраток, полученные в наших экспериментах, соответствуют ранее опубликованным величинам [20], охватывая весь диапазон их значений вплоть до 1,5·сут$^{-1}$. По данным [62] максимальная скорость роста численности *B. plicatilis* не превышает 0,054·ч$^{-1}$, т.е. около 1,3·сут$^{-1}$. Однако при питании водорослью *Synechococcus sp.* (7 ·10^{6} кл·мл$^{-1}$) этот вид демонстрировал рекордные скорости роста – до 1,58·сут$^{-1}$ [89]. Близкие значения μ получены нами на вторые сутки эксперимента с культурами *D. salina* и *Ph. tricornutum*. Рост численности коловраток в первые сутки эксперимента характе-

ризовался меньшими величинами μ, 0,35 – 0,5·сут$^{-1}$, которые наблюдали ранее при питании разными водорослевыми кормами, включая *I. galbana* [11,103].

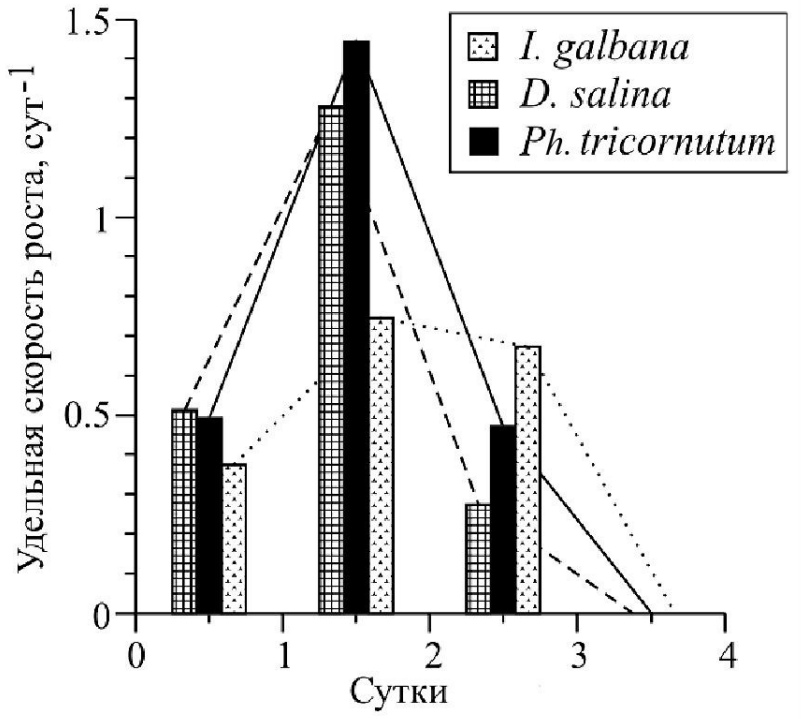


Рис. 3. 2. Удельная скорость роста численности *B. plicatilis* при питании микроводорослями *D. salina, I. galbana* и *Ph. tricornutum*

Максимальная численность *B. plicatilis* во всех экспериментальных сосудах была достигнута на третьи сутки роста, причем наибольший прирост был получен при питании *Ph. tricornutum,* а наименьший – *I. galbana.* В это же время удельные скорости роста коловраток при питании *D. salina* и *Ph. tricornutum* резко снизились в связи с резким снижением концентрации клеток данных видов микроводорослей в результате выедания их коловратками. Начиная с 4-х суток эксперимента, численность коловраток во всех сериях экспериментов резко упала, что было связано с полным исчерпанием пищевых ресурсов (микроводорослей).

Таким образом, с учётом того, что стартовая численность коловраток и биомассы предложенных в качестве корма видов микроводорослей были одинаковы, можно заключить, что наибольший прирост численности коловраток был получен при питании *Ph. tricornutum*, а наименьший - при питании *I. galbana*, который широко используется в аквакультуре *B. plicatilis*.

Рост различных видов микроводорослей в контроле отличался друг от друга незначительно (рис. 3. 3). Несмотря на то, что при питании коловраток *Ph. tricornutum* был получен максимальный прирост численности коловраток, биомасса микроводорослей этого вида снижалась медленнее, по-видимому, в связи с тем, что темпы выедания клеток этого вида были ниже по сравнению с другими видами.

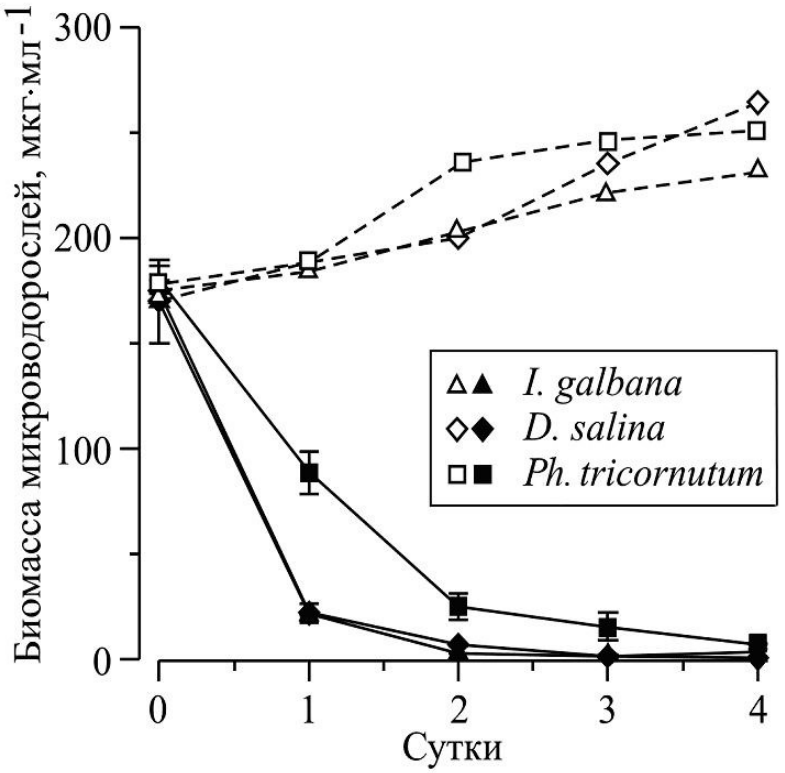


Рис. 3. 3. Динамика биомассы микроводорослей в контроле (прерывистые линии) и опыте (сплошные линии)

Рацион коловраток, питавшихся *Ph. tricornutum* в первые сутки эксперимента, был ниже, чем на других видах микроводорослей (рис. 3. 4). На вторые сутки он резко снижался во всех сосудах, в большей степени – при питании *I. galbana* и *D. salina,* поскольку коловратки отфильтровывали эти микроводоросли быстрее. Относительно высокие значения рациона коловраток на вторые сутки эксперимента, полученные при их питании *Ph. tricornutum*, можно также объяснить большим приростом микроводорослей в контроле (а, следовательно, и в экспериментальных сосудах). На третьи сутки, с увеличением плотности коловраток (рис. 3. 1), и снижени-

ем биомассы микроводорослей (рис. 3. 3), происходило снижение рациона во всех экспериментальных сосудах, что согласуется с ранее опубликованными результатами [4].

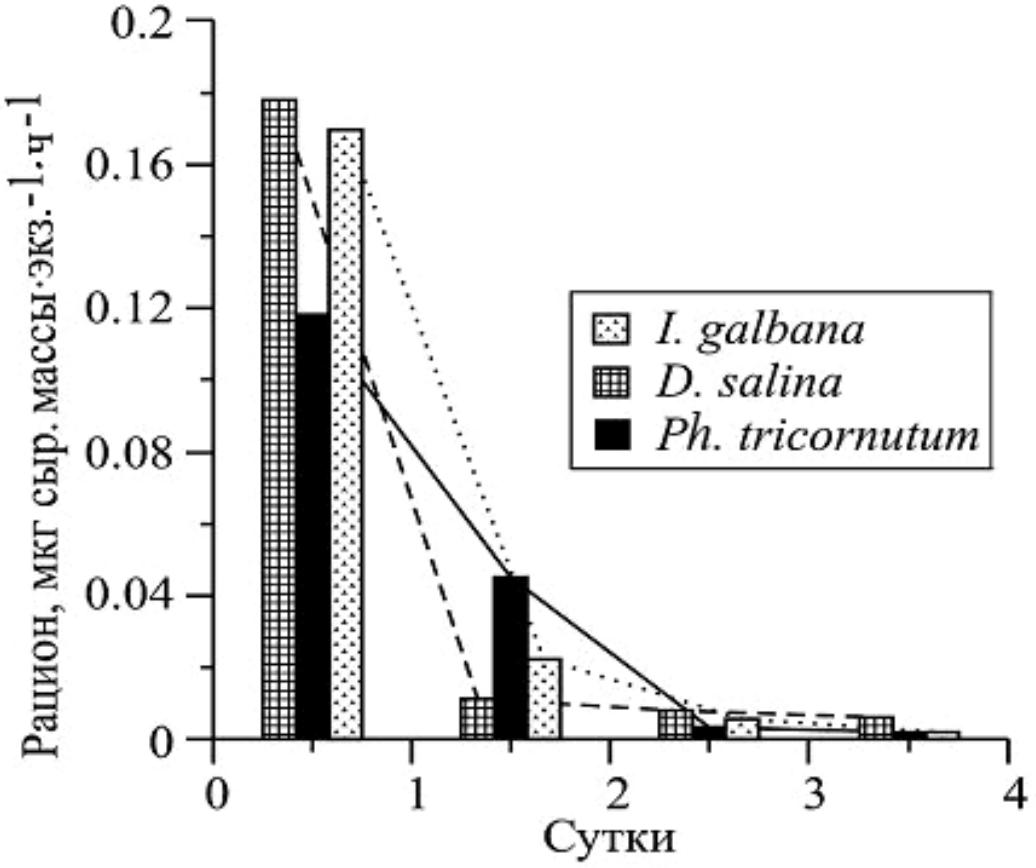


Рис. 3. 4. Динамика рациона коловраток *B. plicatilis* при питании микроводорослями *D. salina, I. galbana* и *Ph. tricornutum*

В соответствии с множественной регрессионной моделью [122], которая описывает зависимость рациона коловраток от веса особи, размеров потребляемого живого корма, объема среды, приходящегося на одну особь, и температуры, рацион *B. plicatilis* в первые сутки нашего эксперимента должен был бы составлять 0,67, 0,06 и 0,13 мкг сыр. массы·экз.$^{-1}$·ч$^{-1}$ при питании, соответственно, *D. salina*, *Ph. tricornutum* и *I. galbana*. Величины, которые были получены в эксперименте (соответственно, 0,18, 0,12 и 0,17 мкг сыр. массы·экз.$^{-1}$·ч$^{-1}$), в целом, хорошо согласуются с моделью. Расхождения связаны, на наш взгляд, с тем, что, во-первых, модель

не учитывает концентрацию микроводорослей в среде, и, во-вторых, универсальность модели (она применима к большой систематической группе – кладоцерам) снижает точность её прогноза. Расчетная величина рациона на основе *Ph. tricornutum* сильно занижена, по-видимому, из-за малого размера клеток этого вида. Таким образом, модели с высокой степенью обобщения должны применяться в подобного рода аппроксимациях с большой осторожностью.

Применение к нашим данным другой регрессионной зависимости, полученной для пары *B. plicatilis* - *I. galbana* и описывающей связь рациона с температурой и концентрацией микроводорослей [124], даёт величину около 2000 кл·экз.$^{-1}$·ч$^{-1}$. В первые сутки нашего эксперимента рацион коловраток, питающихся *I. galbana*, был существенно выше – 3260 кл.·экз.$^{-1}$·ч$^{-1}$. Это значение вполне соответствует максимальным рационам коловраток рода *Brachionus,* который может достигать 4000 кл·экз.$^{-1}$·ч$^{-1}$ [125]. Есть и иные работы, в которых приводятся рационы *B. plicatilis* при питании *I. galbana* [122], значительно превышающие полученные в нашем исследовании (20 нг С·экз.$^{-1}$·ч$^{-1}$ против 9 нг С·экз.$^{-1}$·ч$^{-1}$ в нашей работе). Наши результаты указывают на то, что в модели [124], пороговая величина рациона сильно занижена.

Таким образом, результаты, представленные на рис. 3. 1 – 3. 4, позволили предположить, что насыщение коловраток клетками *Ph. tricornutum* происходило быстрее. Утилизация коловратками *Ph. tricornutum* для размножения происходила более эффективно в сравнении с другими видами микроводорослей, и это преимущество могло быть реализовано на всех стадиях питания – от поимки и обработки отдельных клеток микроводорослей до процессов преобразования их биомассы в биомассу выедателей.

Действительно, расчеты скоростей фильтрации микроводорослей *F*, (рис. 3. 5) показали, что при питании *Ph. tricornutum* коловратки облавливали меньший объём в единицу времени. Высокие скорости фильтрации коловратками *D. salina* и *I. galbana* косвенно указывали на то, что животные затрачивали больше усилий (и, следовательно, энергии) на поиск и поимку этих видов, что могло быть одной из причин того, что общий прирост численности коловраток на этих видах был низким.

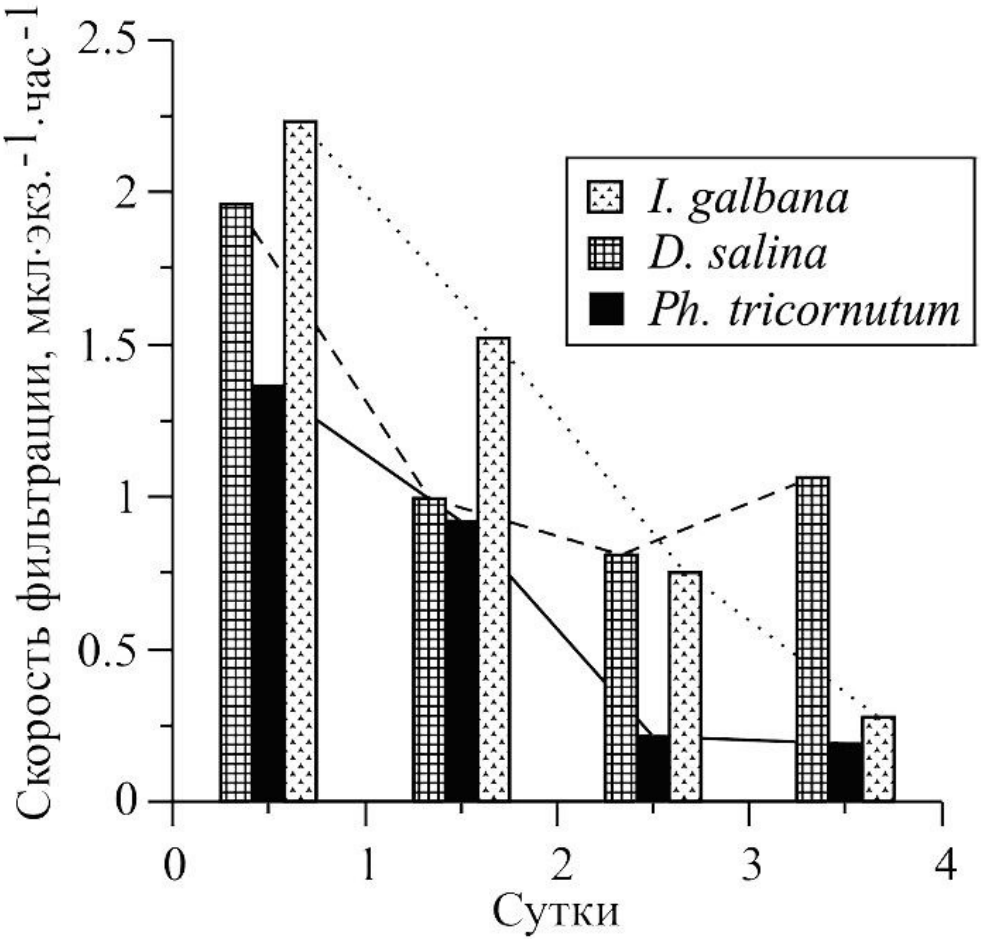


Рис. 3. 5. Динамика скорости фильтрации среды коловратками *B. plicatilis* при питании *D. salina, I. galbana* и *Ph. tricornutum*

Доступные в литературе оценки скорости осветления среды *B. plicatilis* варьируют в широком диапазоне – от 0 до 90 мкл·экз.$^{-1}$·ч$^{-1}$, однако величины *F* в несколько десятков мкл вызывают большие сомнения. В некоторых случаях приводятся некорректные значения, по-видимому, вследствие опечаток или ошибок в расчетах. Например, в работе [97] величины *F* составляют 8-28 мл·экз.$^{-1}$·ч$^{-1}$, а в соответствии с табличными данными фильтрация *I. galbana* в смеси микроводорослей равна 35 мкл· экз.$^{-1}$·ч$^{-1}$ (при концентрации изохризиса 0,3 · 10^{6} кл·мл$^{-1}$), что более чем на порядок выше наших оценок. В работе [139] приводят значения 5-7 мкл·экз.$^{-1}$·ч$^{-1}$ для *D. salina*, однако указывают, по-видимому, ошибочно низкую концентрацию микроводорослей – 50-200 кл·мл$^{-1}$. Другие авторы [103] получили близкие значения для

пары *B. plicatilis* - *I. galbana* – 0,1-8,0 мкл·экз.$^{-1}$·ч$^{-1}$, которые в большей степени согласуются с нашими данными и публикациями по другим видам коловраток. В этой работе величина *F* составляла около 1 мкл·экз.$^{-1}$·ч$^{-1}$ при концентрации микроводорослей 10 мкг С·мл$^{-1}$, что несколько ниже наших оценок.

Экспериментальные данные о приросте и рационе коловраток при питании каждым из видов микроводорослей позволили оценить индивидуальную продукцию *B. plicatilis* в единицах биомассы и эффективность роста K_1 (табл. 3. 1).

Таблица. 3. 1

Продукционные показатели и рацион *B. plicatilis* в первые сутки эксперимента

Продукционные показатели и рацион	*D. salina*	*Ph. tricornutum*	*I. galbana*
Общая продукция (мкг сыр. массы·мл^{1}·ч$^{-1}$)	33,7	28,3	17,9
Продукция/особь (нг сыр. массы· экз.$^{-1}$·ч$^{-1}$)	35,3	32,6	19,2
Рацион (нг сыр. массы·экз.$^{-1}$· ч$^{-1}$)	178	118	170
Эффективность роста K_1 (%)	19,8	27,6	11,3
Удельная скорость роста численности (сут$^{-1}$) усредн. за 1-3 сутки	0,78	0,96	0,16

Расчеты рациона были произведены только для первых суток эксперимента, поскольку в подобного рода измерениях их ошибка растёт с увеличением продолжительности эксперимента [11]. Результаты расчетов показали, что величина K_1 изменялась в широком диапазоне (от 10% до 30%) в зависимости от вида корма: при питании *Ph. tricornutum* она составила 27,6%, *D. salina* – 19,8% и *I. galbana* – 11,3% (табл. 3.1). Полученные нами величины K_1 хорошо согласуются с ранее опубликованными, немногочисленными оценками эффективности роста *B. plicatilis* на микроводорослевых кормах, которые лежат в диапазоне 0,2 - 0,4 [11, 105]. Валовая эффективность роста *B. plicatilis* на *I. galbana* оказалась столь низкой, что вышла за преде-

лы этого диапазона. Удельная скорость роста численности, усредненная за 1-3 сутки эксперимента, т.е. соответствующая среднему интервалу пересева коловраток при накопительном культивировании, также была максимальна (0,96 сут $^{-1}$) при питании *Ph. tricornutum* и минимальна (0,16 сут $^{-1}$) – при питании *I. galbana* (табл. 3. 1.).

Таким образом, максимальный прирост численности коловраток в течение первых 3 суток эксперимента при питании *Ph. tricornutum* достигается при более низком рационе, скорости фильтрации (и, следовательно, при более низких физиологических тратах на фильтрацию) и при самой высокой скорости роста численности и эффективности роста по сравнению с группами коловраток, питавшихся *D. salina* и *I. galbana*.

В случае дефицита доступной пищи *B. plicatilis* способны восполнять свой рацион бактериями [134], поэтому особый интерес представляла информация о динамике бактериальной популяции в каждом из экспериментальных сосудов. Изменения численности бактерий в ходе эксперимента представлены на рисунке 3. 6. В контроле она менялась незначительно, тогда как в опыте – снижалась более чем вдвое. Это действительно указывало на то, что после исчерпания основного пищевого ресурса – микроводорослей, коловратки пополняли свой рацион бактериями, причем скорость их фильтрации была достаточно велика – максимальные величины составляли 0,58 (*Ph. tricornutum*, 2-е сутки), 0,38 (*D. salina*, 2-е сутки) и 0,17 мкл·экз.$^{-1}$ ·ч$^{-1}$ (*I. galbana*, 3-е сутки). Однако вклад бактерий в общий рацион коловраток оказался на 2 порядка ниже – его расчётные величины составляли от 1,5 до 4 нг сыр. массы·экз.$^{-1}$· ч$^{-1}$ (против 120-180 нг сыр. массы·экз.$^{-1}$·ч$^{-1}$ для микроводорослей). Следует, вместе с тем, отметить, что бактериальная часть рациона коловраток могла быть сильно недооценена из-за заниженной оценки бактериальной продукции в опыте. Несмотря на малый прирост бактерий в контроле, в экспериментальных сосудах бактериальная продукция могла быть велика, например, из-за разрушения клеток микроводорослей в процессе их выедания и, как следствие, поступления в среду большого количества органических веществ. На это, в частности, может указывать рост численности бактерий в опыте в первые сутки эксперимента

(пики бактериальной численности в сосудах с *Ph. tricornutum* и *D. salina* в опыте на вторые сутки эксперимента, рис. 3. 6).

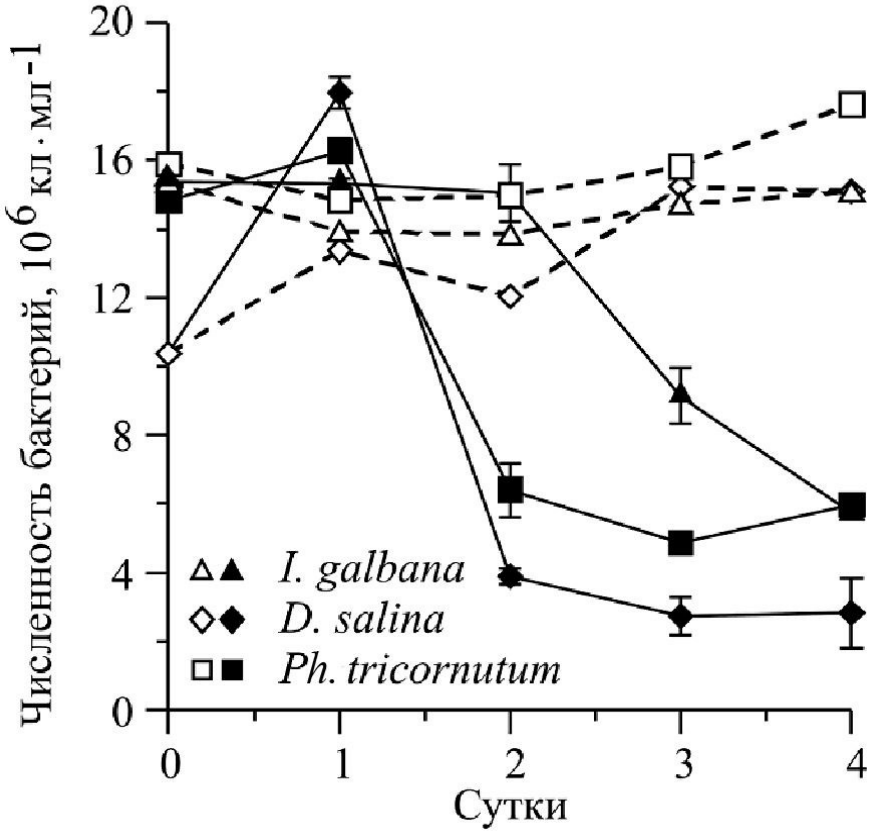


Рис. 3. 6. Динамика численности бактерий в контроле (пунктир) и опыте (сплошные линии)

Кроме того, в ряде экспериментальных и полевых исследований было показано, что увеличение пресса выедания стимулирует рост бактериальных популяций [113]. Для того, чтобы корректно и в полной мере оценить долю бактерий в общем рационе *B. plicatilis*, необходимо измерять валовую бактериальную продукцию в экспериментальных сосудах, что методологически сложно. Одним из решений этой задачи могло бы стать применение метода разбавлений [145], который позволяет одновременно измерять как скорость элиминации микроорганизмов вследствие их выедания, так и удельную скорость их роста.

Таким образом, результаты эксперимента позволяют сделать следующие выводы: при равных стартовых биомассах микроводорослей наибольший прирост численности коловраток был получен при их питании *Ph. tricornutum*, наименьший -

при питании *I. galbana.* Эффективность роста ($К_1$) коловраток также была максимальна (27,6%) при питании *Ph. tricornutum* и минимальна (11,3%) – при питании *I. galbana*. Рацион и скорость фильтрации зависели от величины $К_1$, а именно, при низких значениях $К_1$ (*D. salina, I. galbana*) коловратки облавливали больший объём среды и тем самым увеличивали рацион.

По мере исчерпания основного пищевого ресурса – микроводорослей доля бактерий в общем рационе коловраток увеличивалась, однако вклад бактерий в питание коловраток можно считать несущественным. На основании изложенного *Ph. tricornutum* может быть рекомендован в качестве одного из эффективных кормов при культивировании коловраток *B. plicatilis*.

3. 2. Влияние пищевой адаптации коловраток на видовую и размерную селективность питания *B. plicatilis*

При анализе влияния предварительной трофической адаптации коловраток к потреблению одного из видов микроводорослей *I. galbana* (группа А), *D.salina* (группа Б) и *Ph. tricornutum* (группа В), на селективность питания *B. plicatilis* в смеси данных видов было выявлено следующее:

Во всех экспериментальных сосудах скорость выедания микроводорослей коловратками достигала максимума (1-2 $\cdot 10^3$ кл·экз.$^{-1}$·ч$^{-1}$) спустя 3 часа после начала эксперимента и затем снижалась до минимальных значений (<0,5 $\cdot 10^3$ кл·экз.$^{-1}$ ·ч$^{-1}$). В каждой из адаптационных групп скорость потребления *Ph. tricornutum* была максимальной, а *D. salina* – минимальной, т.е. из трех предложенных видов микроводорослей коловратки отдавали наибольшее предпочтение *Ph. tricornutum* (хорошо выраженная видовая селективность) (рис. 3. 7). Анализ скорости потребления каждого из видов микроводорослей коловратками разных адаптационных групп позволил выявить зависимость этой величины от предварительной трофической адаптации *B. plicatilis*.

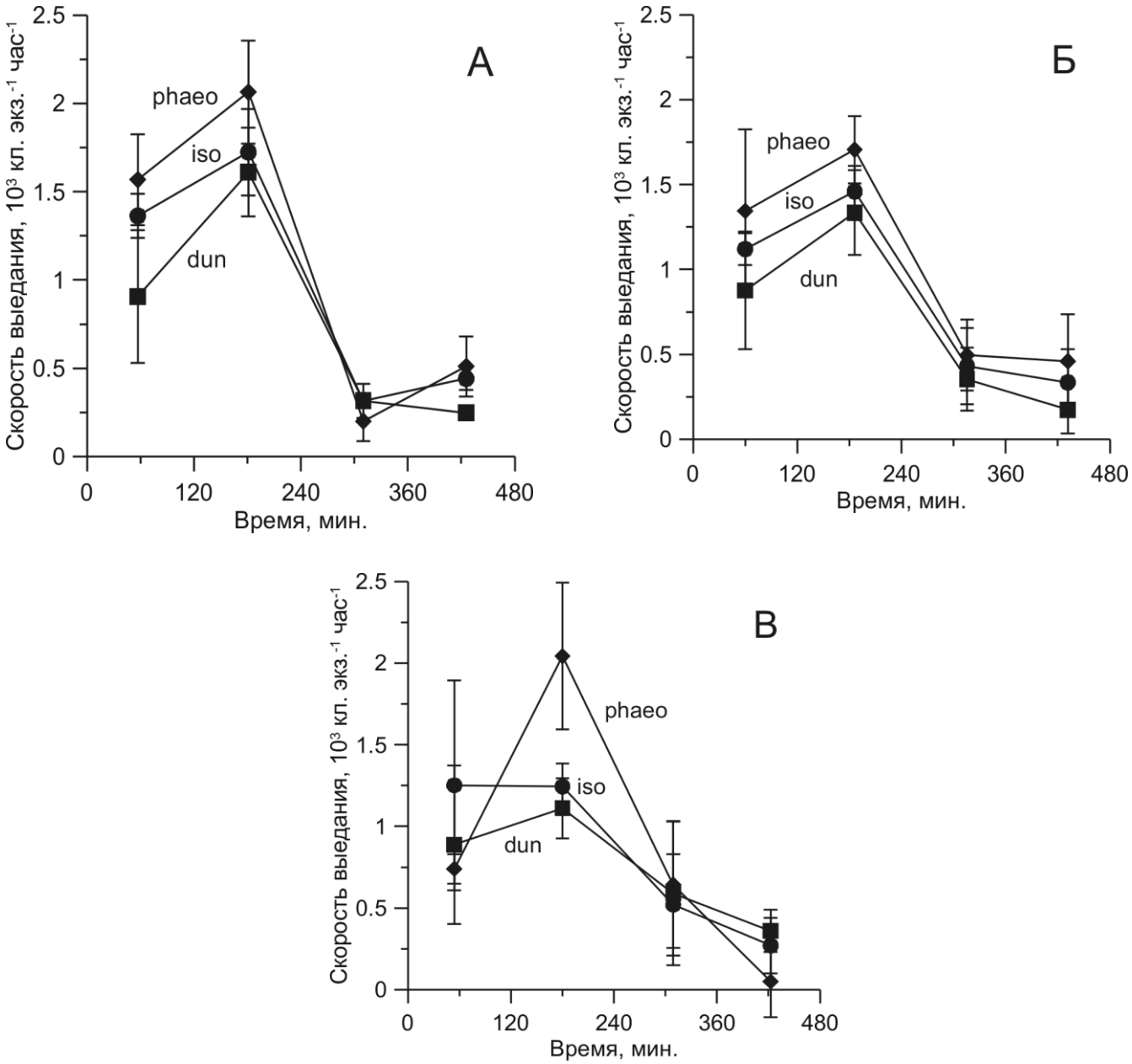


Рис. 3. 7. Скорость выедания клеток микроводорослей в смеси *Ph. tricornutum* (phaeo), *I. galbana* (iso), *D. salina* (dun) группами коловраток адаптированными к А - *I. galbana,* Б – *D. salina,* В - *Ph. Tricornutum*

В частности, скорость выедания микроводорослей *I. galbana,* в момент максимальной скорости выедания (через 3ч.) была выше в группе А ($1{,}7 \cdot 10^3$ кл·экз.$^{-1}$·ч$^{-1}$), т.е. в той группе, которая была адаптирована к этому виду. В группах Б и В, клетки этого вида выедались медленнее. Такую же зависимость наблюдали и в группе В (адаптированной к *Ph. tricornutum)* где скорость выедания *Ph. tricornutum* также была выше, чем в других группах ($2{,}1 \cdot 10^3$ кл·экз.$^{-1}$·ч$^{-1}$) (рис. 3. 7). Скорость потребле-

ния *D. salina* коловратками из всех пре-адаптированных групп была несколько ниже, чем других видов микроводорослей. Возможно, это связано с тем, что *D. salina* не соответствует биохимическим потребностям коловраток. На это также указывают более низкие скорости потребления всех микроводорослей в смеси коловратками адаптационной группы Б – питавшихся в течение двух недель до эксперимента *D. salina* (рис. 3. 7). Можно предположить, что животные этой группы находились в угнетённом состоянии.

Рис. 3. 8. Коловратка в смеси микроводорослей (фото автора)

Таким образом, в процессе проведённых экспериментов было определено, что предварительная трофическая адаптация к питанию определенным кормом влияет на скорость потребления клеток *B. plicatilis*, что может отражаться и на темпах размножения. Полученные данные целесообразно использовать с целью повышения эффективности культивирования коловраток.

РАЗДЕЛ 4

КОНТРОЛЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КОНТАМИНАЦИЙ В СИСТЕМЕ ВЫРАЩИВАНИЯ КАЛКАНА И ЕГО КОРМОВЫХ ОРГАНИЗМОВ

Низкая выживаемость личинок на ранних стадиях развития, обусловленная вспышками бактериальных инфекций – одна из самых актуальных проблем в технологии культивирования камбалообразных. Повышенное бактериальное число в средах выращивания личинок (СВЛ) и их кормовых организмов (КО) – результат интенсивных технологий, предполагающих высокую плотность посадки организмов. В результате, происходит насыщение СВЛ большим количеством метаболитов, являющихся субстратом для роста бактерий и характерные для естественной морской среды взаимоотношения между рыбой и ассоциированной с ней микрофлорой нарушаются [44].

Чаще всего, проблемы, связанные с бактериальными контаминациями сред выращивания, возникают на ранних этапах культивирования камбалообразных (инкубация икры, переход личинок на экзогенное питание, введение в их рацион КО). Традиционным решением этой проблемы являются антибиотики, однако их широкое неконтролируемое применение влечет за собой появление резистентных форм бактерий [52], накопление препаратов в аквакультурной продукции и т.д. В связи с этим существует необходимость разработки альтернативных антибактериальных методов [101].

4. 1. Применение хлорамфеникола при культивировании микроводорослей *I. galbana* и коловраток *B. plicatilis*

Применение антибиотиков – традиционный метод снижения численности бактерий в СВЛ и их КО. Одним из наиболее широко применяемых антибактериальных препаратов является хлорамфеникол - синтетический антибиотик широкого спектра

действия. Он активно используется большинством развивающихся стран, однако данные о методике его применения, эффективности и степени токсичности противоречивы. В данной работе была исследована эффективность воздействия различных концентраций хлорамфеникола (5, 10, 50 и 500 мг·л$^{-1}$) на микрофлору среды микроводорослей *I. galbana* и коловраток *B. plicatilis* - начальных звеньев пищевой цепи в технологической схеме искусственного культивирования калкана, которые часто являются вектором передачи патогенных бактерий личинкам.

<u>Эксперимент 1 (а).</u> Влияние различных концентраций хлорамфеникола на физиологическое состояние клеток микроводорослей *I. galbana* и динамику численности бактерий в их среде. Во всех исследованных концентрациях хлорамфеникол оказывал токсическое действие на клетки микроводорослей, которое проявлялось в достоверном снижении численности ВСХ-клеток (рис. 4. 1 А) и увеличении доли НСХ-клеток относительно контроля, не содержащего антибиотик (рис. 4. 1 Б).

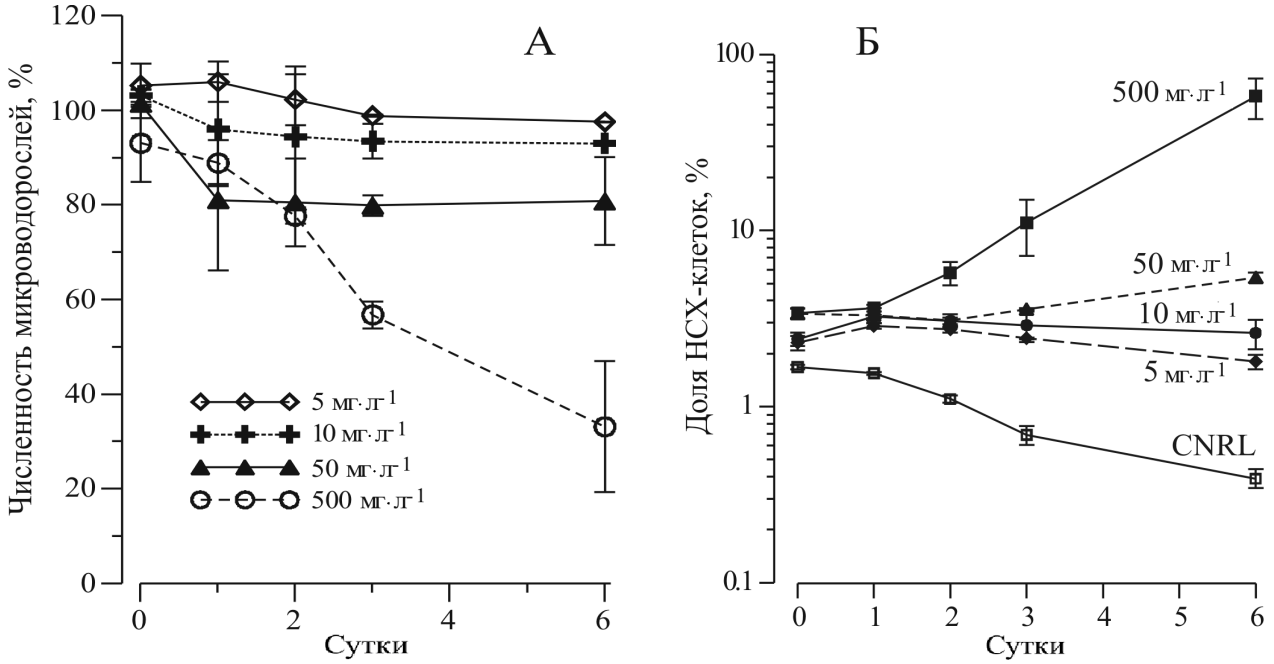


Рис. 4. 1. Динамика общей численности клеток (% от контроля) (А) и доли НСХ-клеток в общей численности микроводорослей (Б) в культуре *I. galbana* при разных концентрациях хлорамфеникола

Токсический эффект проявлялся с первых суток эксперимента, и его степень была пропорциональна концентрации антибиотика.

В начале эксперимента доля НСХ-клеток во всех сосудах составляла около 2 % от их общей численности. К концу эксперимента в контроле она снижалась до 0,39 ± 0,06 %, при концентрациях хлорамфеникола 5 и 10 мг·л$^{-1}$ изменялась незначительно (соответственно до 1,8 ± 0,2 % и 2,6 ± 0,5 %), а при 50 и 500 мг·л$^{-1}$ возрастала, соответственно до 5,4 ± 0,35 % и 57,9 ± 15,1 %. Таким образом, высокие концентрации антибиотика были причиной массовой деградации и гибели клеток микроводорослей.

Добавление хлорамфеникола в культуру *I. galbana* приводило к снижению численности бактерий в ней, однако зависимости бактерицидного эффекта от концентрации антибиотика не было выявлено: во всех случаях на 6-е сутки численность бактерий снижалась приблизительно на 50% относительно контроля (рис. 4. 2 А).

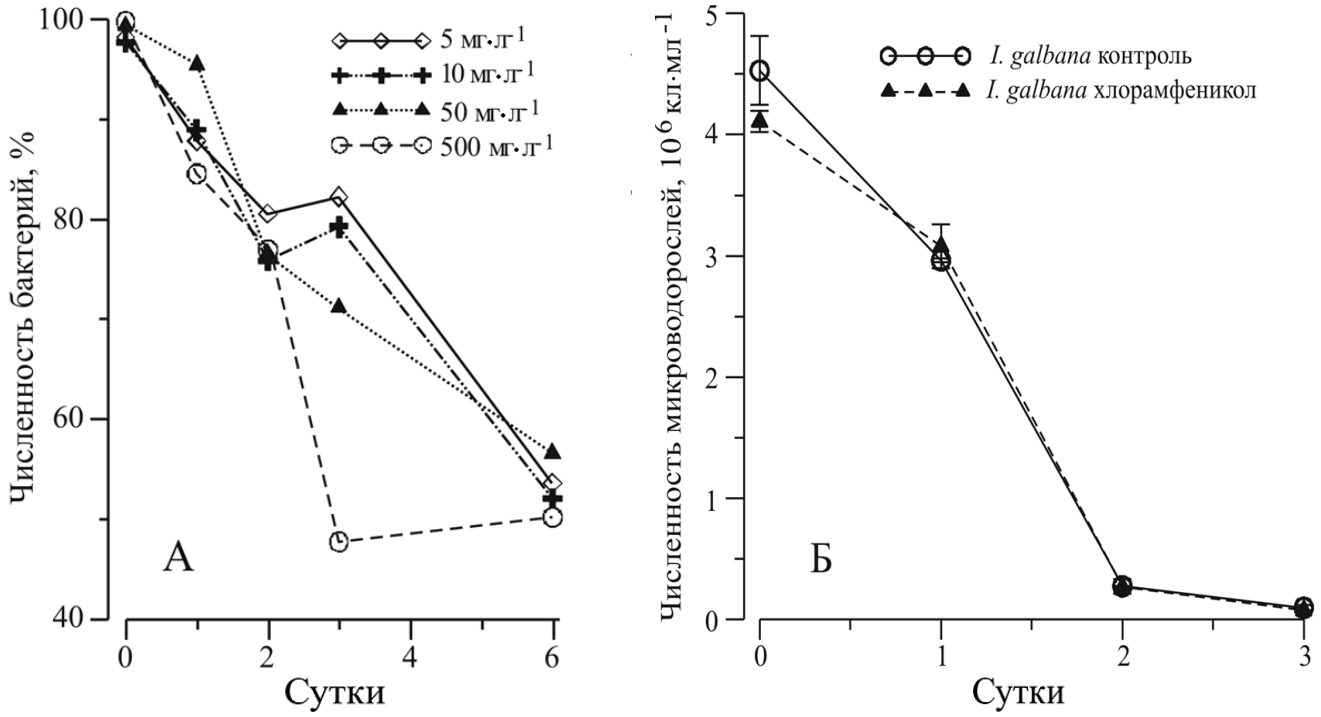


Рис. 4. 2. Динамика численности бактерий (% от контроля) в культуре *I. galbana* при разных концентрациях хлорамфеникола (А) и динамика численности клеток *I. galbana* в среде выращивания *B. plicatilis* (Б)

Можно предположить, что, во-первых, только около половины бактериальной популяции составляли штаммы, чувствительные к хлорамфениколу, и, во-вторых, минимальной концентрации антибиотика (5 мг·л$^{-1}$) было достаточно для их элиминации. Увеличение его дозы не влияло на выживаемость резистентных по отношению к данному антибиотику штаммов бактерий, но, как показано выше, оказывало негативный эффект на микроводоросли.

В некоторых работах сообщается о наличии резистентных к хлорамфениколу штаммов бактерий, в том числе и таких патогенов морских рыб, как *Pseudomonas* и *Vibrio* (*V. harveyi*) [61, 100, 133]. В ряде публикаций также указывают на токсическое действие хлорамфеникола на клетки микроводорослей [80, 81, 151] и угнетение фотосинтетического аппарата клеток *I. galbana*, что согласуется с приведенными нами результатами [151]. Однако информация о рекомендуемых дозах хлорамфеникола, степени их токсичности и антибактериальном эффекте противоречива. В некоторых работах [80] сообщается об отсутствии выраженного негативного влияния хлорамфеникола на клетки *I. galbana* при концентрациях до 12 мг·л$^{-1}$. В исследовании [142] рекомендуют использовать дозировки хлорамфеникола 10 мг·л$^{-1}$, указывая при этом на снижение численности бактерий (42 %) уже через 3 ч и отсутствие негативного влияния на клетки изохризиса при этой дозировке. По нашим данным выраженное снижение численности бактерий при всех концентрациях хлорамфеникола происходит только на 6 сутки, при этом угнетение физиологического состояния клеток микроводорослей происходит уже при концентрации 5 мг·л$^{-1}$.

<u>Эксперимент 2 (а).</u> Динамика численности бактерий в среде с коловратками при их питании клетками культуры микроводорослей *I. galbana,* обработанной хлорамфениколом. Добавление культуры *I. galbana*, обработанной хлорамфениколом (концентрация – 5 мг·л$^{-1}$), в среду культивирования *B. plicatilis* не влекло за собой отказа коловраток от пищи и не оказывало токсического эффекта на животных. Клетки микроводорослей, обработанные хлорамфениколом, выедались коловратками с той же скоростью, что и в контроле (рис. 4. 2 Б).

Численность бактерий в среде *B. plicatilis* при добавлении обработанной культуры микроводорослей была ниже, чем в контроле, в течение всего эксперимента

(рис. 4. 3 А), в то время как прирост численности коловраток, питающихся обработанными хлорамфениколом микроводорослями, был несколько выше такового в контроле (рис. 4. 3 Б).

Таким образом, можно предположить, что снижение численности бактерий в культуре коловраток положительно влияет на их воспроизводство, а уменьшение бактериальной нагрузки в среде их выращивания может снизить темпы колонизации бактериями покровов и кишечника коловраток, и, как следствие, снизить риск бактериальных инфекций у питающихся ими личинок рыб.

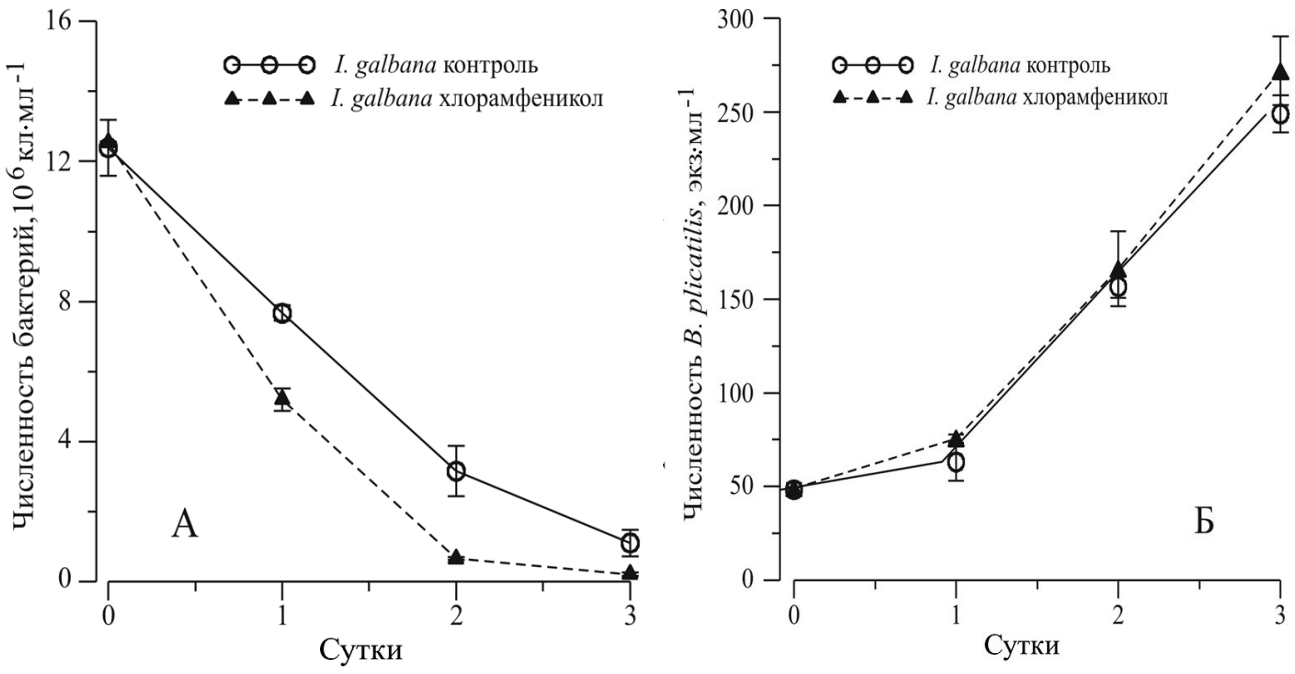


Рис. 4. 3. Динамика численности бактерий в среде выращивания коловраток (А) и численности *B. plicatilis*, питающихся необработанными и обработанными хлорамфениколом микроводорослями *I. galbana* (Б)

Опубликованных данных о влиянии хлорамфеникола на *B. plicatilis* очень мало. Сообщается о токсическом эффекте, оказываемом хлорамфениколом на коловраток и его негативном влиянии на их воспроизводство при концентрациях 30 – 100 мг·л$^{-1}$ [57]. Учитывая полученные нами данные, можно предположить, что ток-

сический эффект, как и в случае с микроводорослями, определяется концентрацией антибиотика, и концентрация < 5 мг·л$^{-1}$ токсичной для коловраток не является.

Исследование влияния предварительно обработанной антибиотиком культуры микроводорослей на численность бактерий в среде с коловратками представляет собой практический интерес. В мировой аквакультуре, антибиотики обычно добавляют непосредственно в среду с *B. plicatilis* при внесении микроводорослей, при этом рекомендуемая концентрация хлорамфеникола составляет 10 мг·л$^{-1}$. Однако результаты нашего исследования позволяют считать, что для снижения численности бактерий в среде с питающимися коловратками более целесообразна предварительная обработка хлорамфениколом (концентрация 5 мг·л$^{-1}$) именно среды микроводорослей в течение суток, т. к. для элиминации бактерий требуется время. Заметное снижение численности бактерий в среде с микроводорослями происходило только через 24 ч (рис. 4. 2 А). Такой метод обработки культур позволил бы снизить численность бактерий, поглощаемых *B. plicatilis* вместе с клетками микроводорослей, уже в первые часы кормления, тогда как добавление антибиотика непосредственно в среду с питающимися животными (обычная практика) не позволяет этого сделать в такой короткий срок, и большое число бактерий успевает попасть в пищеварительный тракт коловраток. Кроме того, антибиотик, вносимый в среду коловраток вместе со средой обработанных им микроводорослей, предупреждает дальнейшее развитие бактерий в ней.

Таким образом, показано, что хлорамфеникол в концентрациях 5, 10, 50 и 500 мг·л$^{-1}$ оказывает токсическое действие на клетки культуры микроводоросли *I. galbana,* при этом снижение темпов роста культуры пропорционально концентрации антибиотика. Бактерицидный эффект хлорамфеникола не зависит от его концентрации в культуре *I. galbana*. Кормление коловраток *B. plicatilis* культурой микроводорослей *I. galbana,* предварительно обработанной хлорамфениколом, не оказывает негативного влияния на их воспроизводство и ведёт к снижению бактериальной численности в среде их выращивания.

Хлорамфеникол является одним из самых дешевых и доступных антибиотиков, что и определяет его широкое использование. Однако при этом необходимо

учитывать негативные стороны применения этого препарата. Во-первых, многие патогенные штаммы бактерий, как уже упоминалось выше, обладают резистентностью к данному виду антибиотика, т.е. проблему инфекционных заболеваний он решает только частично. Во-вторых, хлорамфеникол даже в минимальных концентрациях оказывает токсическое действие на клетки микроводорослей, что делает невозможным его применение в целях снижения бактериальной численности в их периодических культурах. Негативным фактором является также попадание хлорамфеникола в естественные водоемы, что неизбежно при промышленном выращивании аквакультурных объектов. Необходимо также отметить, что, многие страны отказываются от продукции, содержащей хлорамфеникол, т.к. он представляет собой опасность для здоровья человека [108].

Все перечисленные негативные аспекты применения данного антибиотика обусловливают необходимость поиска альтернативных решений проблемы бактериальной контаминации сред выращивания, как личинок, так и их кормовых организмов. Большое внимание в данном вопросе уделяют микроводорослям.

4. 2. Влияние микроводорослей и их фильтратов на рост бактериальной микрофлоры в средах инкубации икры и личинок калкана

Применение антибиотиков с целью снижения численности бактерий в системе выращивания камбалообразных сопряжено с рядом проблем: появление резистентных форм бактерий, снижение качества продукции, риск для здоровья человека и др. В связи с этим приоритетным направлением в развитии аквакультуры является разработка альтернативных методов борьбы с бактериальными контаминациями. Одним из таких методов является применение микроводорослей, которые обладают антибактериальным эффектом. В серии экспериментов, результаты которых приведены ниже, были охвачены все начальные этапы культивирования, когда проблема бактериальных инфекций стоит наиболее остро. Наличие антибактериального эффекта определяли у различных видов микроводорослей: *Ch. vulgaris*, и *D. salina*, *P. viridis*, *I. galbana*, *T. weissflogii*.

<u>Эксперимент 1 (б)</u>. Влияние смеси микроводорослей *Ch. vulgaris* и *P. viridis*, на численность бактерий в среде инкубации икры калкана. В ходе анализа динамики численности бактерий в среде инкубации икры в контрольных (с ПМВ) и экспериментальных (с добавлением смеси микроводорослей) сосудах было выявлено следующее;

В начале эксперимента численность бактерий в контроле была достоверно ниже, чем в опыте с добавлением смеси микроводорослей *Ch. vulgaris* и *P. viridis* (рис. 4. 4). Это можно объяснить тем, что вместе с клетками микроводорослей в среду были привнесены ассоциированные с ними бактерии, которые в норме всегда присутствуют в неаксеничных культурах микроводорослей.

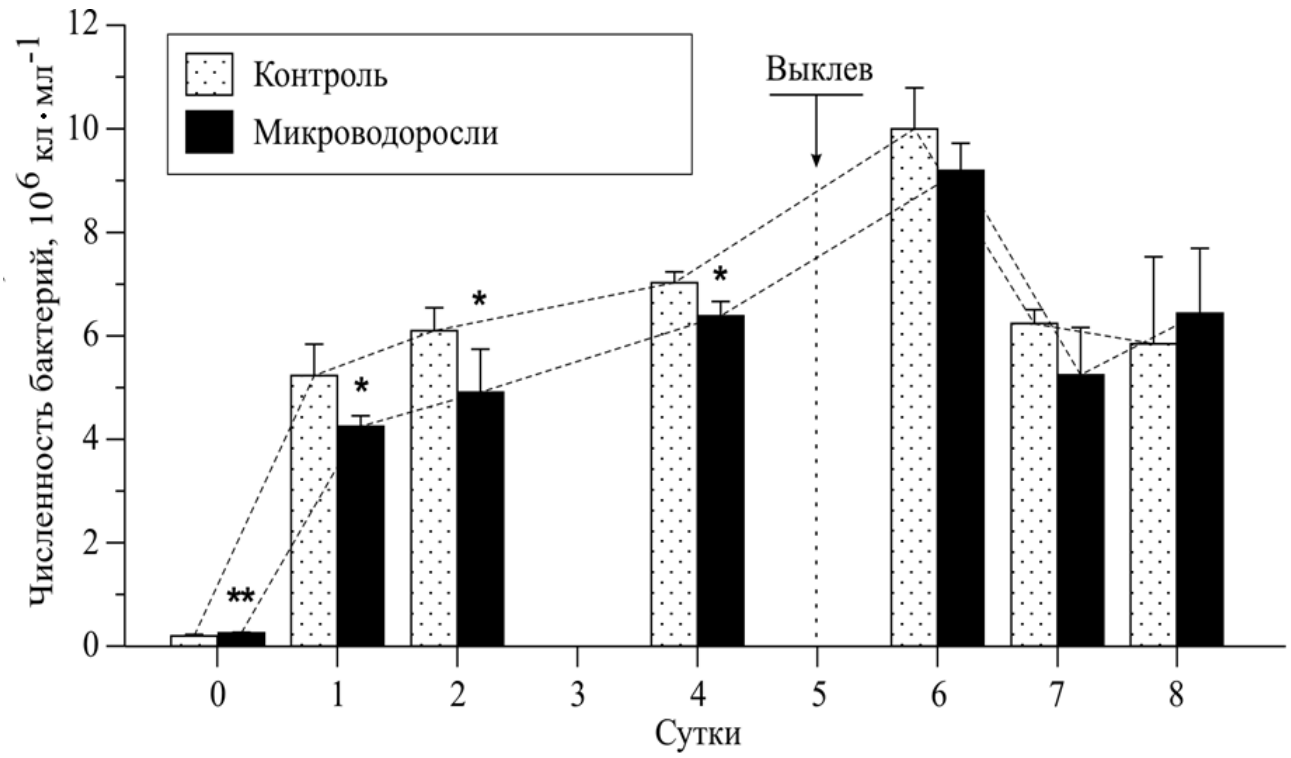


Рис. 4. 4. Динамика бактериального роста в сосудах с икрой калкана до и после выклева личинок (эксперимент 1). Здесь и далее показаны 95% доверительные интервалы. Одна и две звёздочки – результаты, соответственно, достоверно (p<0.05) ниже и выше контроля (t-тест Стьюдента)

В последующие дни рост численности бактерий происходил во всех сосудах, включая контроль. Однако численность бактерий в опыте оставалась достоверно

ниже, чем в контроле, вплоть до выклева личинок на 5-е сут. Это указывало на хорошо выраженный антибактериальный эффект, оказываемый микроводорослями.

После выклева личинок наблюдали бурный рост бактерий, как в контроле, так и в опыте, что свидетельствовало о поступлении в среду органических веществ. При этом достоверной разницы между численностью бактерий в контроле и опыте не выявлено, т.е. антибактериальный эффект отсутствовал. Таким образом, бактерицидный эффект смеси микроводорослей *Ch. vulgaris* и *P. viridis* сохранялся только до выклева личинок.

Соотношение клеток микроводорослей *Ch. vulgaris* и *P. viridis* по численности сохранялось постоянным (около 4:1) вплоть до момента выклева личинок из икры (рис. 4. 5).

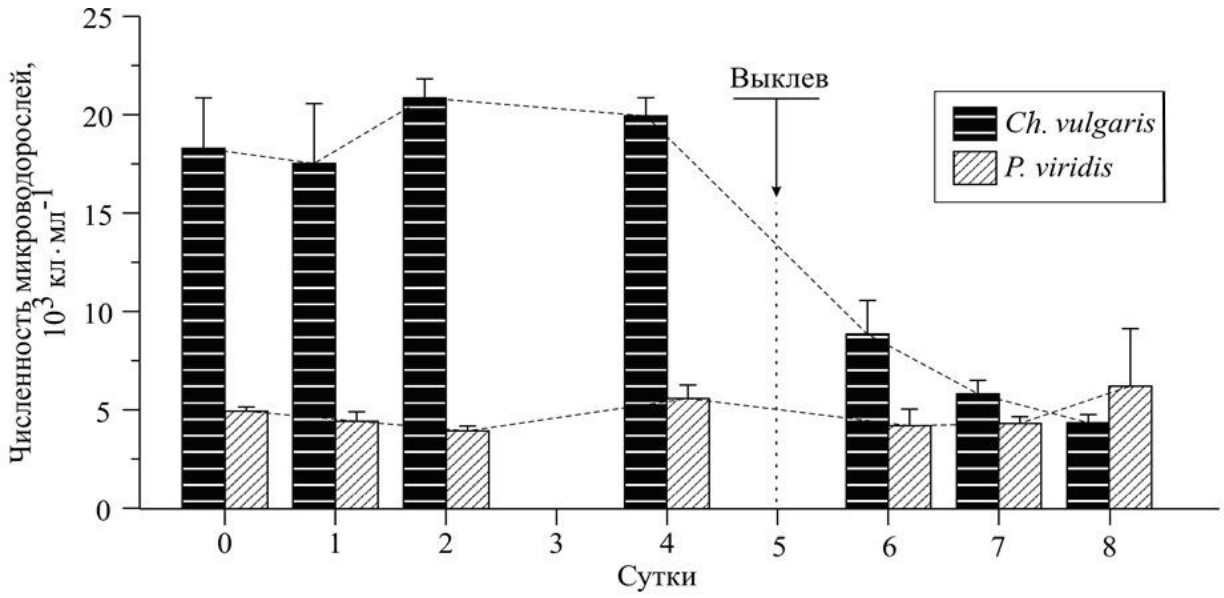


Рис. 4. 5. Динамика численности микроводорослей *Ch. vulgaris* и *P. viridis* в среде инкубации икры

Однако поступление в среду большого количества органики и других веществ в результате разрушения оболочек икры, которое привело и к последующему за этим бактериальному росту, по-видимому, нарушили этот баланс, и численность *Ch. vulgaris* снизилась более чем в 2 раза. Снижение численности микроводорослей, сопровождающее выклев личинок, по-видимому, связано с альгицидным действием

некоторых видов бактерий. Известно, например, что *Pseudomonas* и *Vibrio* способны угнетать рост морских микроводорослей как в экспериментальных условиях [60], так и в естественной морской среде [112].

Можно предположить, что со снижением численности микроводорослей в среде убывал и их антибиотический эффект. Очевидно, он был связан, прежде всего, с *Ch. vulgaris*, поскольку хорошо прослеживалась связь динамики численности этого вида и численности бактерий.

Эксперимент 2 (б). Влияние микроводорослей *Ch. vulgaris*, *D. salina*, *P. viridis*, *I. galbana* и *T. weissflogii* на микрофлору среды с личинками калкана на стадии эндогенного питания. При эндогенном питании личинок, т.е. когда питание осуществляется за счет ресурсов их желточного мешка, загрязнение СВЛ продуктами метаболизма – минимально. Однако дальнейшее развитие личинок (открытие рта, первичные выделения в среду) провоцируют рост численности бактерий. Присутствие в среде микроводорослей может предупредить этот процесс.

В ходе эксперимента, при анализе динамики численности бактерий в среде с эндогенно-питающимися личинками в контрольных (с ПМВ) и экспериментальных (с добавлением микроводорослей *Ch. vulgaris*, *D. salina*, *P. viridis*, *I. galbana* и *T. weissflogii*) сосудах, было установлено следующее. Численность бактерий в контроле изменялась незначительно вплоть до открытия личинками рта и перехода на экзогенное питание (3-е сутки) (рис. 4. 6).

В этот период питание личинок осуществлялось за счет внутренних ресурсов (желточного мешка), в среду выращивания поступало ограниченное количество метаболитов, и бактерии были лишены дополнительного субстрата для роста. В опыте численность бактерий превышала контроль за счет микрофлоры, привнесенной с микроводорослями, например, в сосудах с *D. salina* и *Ch. vulgaris*. Однако на следующие сутки численность бактерий в них значительно снизилась (рис 4. 6).

На 4-е сутки, после перехода личинок на стадию экзогенного питания, численность бактерий в контроле выросла. Вероятно, рост численности бактерий связано с тем, что в этот период у личинок редуцируется желточный мешок, открываются рот и анальное отверстие, через которое в среду попадают первичные выделения.

Вследствие высокой вариабельности данных трудно выявить общую для всех опытов с микроводорослями тенденцию в изменении бактериальной численности на 4-е сутки эксперимента. Исключение составляет *Ch. vulgaris*, в сосуде с которой наблюдали достоверное снижение численности бактерий относительно контроля.

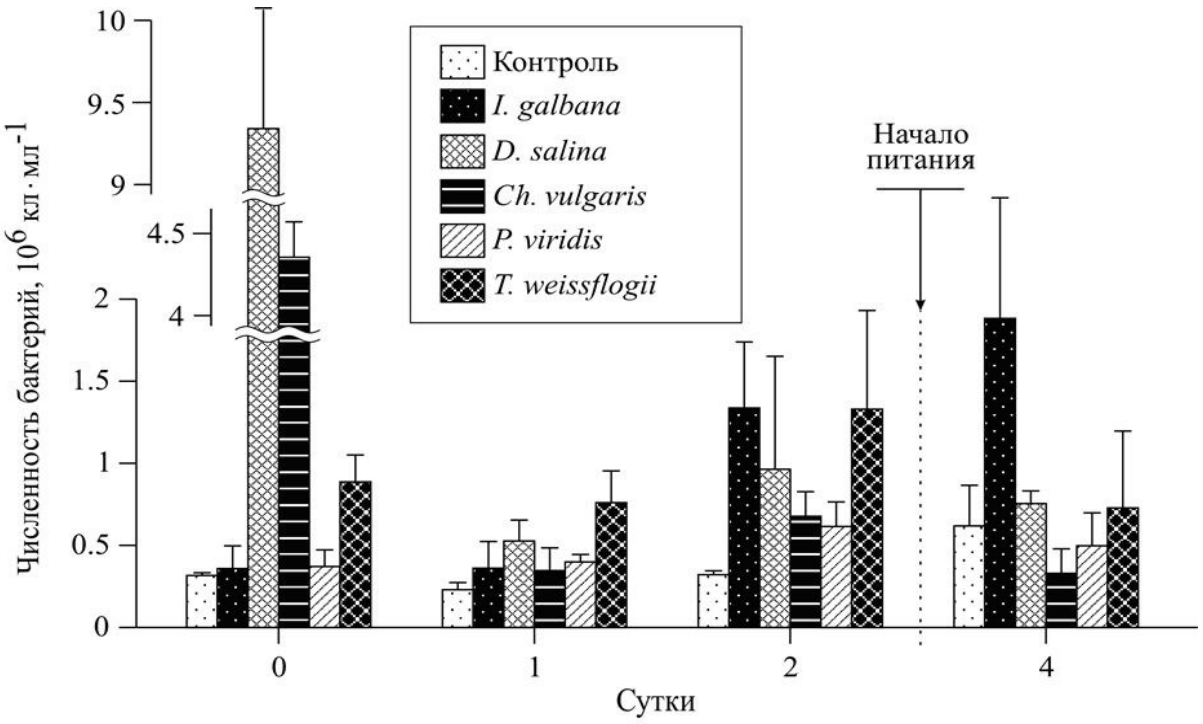


Рис. 4. 6. Динамика численности бактерий в экспериментальных сосудах с личинками на стадии эндогенного питания

Таким образом, несмотря на низкое бактериальное число в контроле на стадии эндогенного питания личинок, добавление хлореллы в этот период представляется целесообразным, так как оно предупреждает бактериальную вспышку после перехода личинок на стадию экзогенного питания.

<u>Эксперимент 3 (б)</u>. Ингибирующий эффект фильтратов микроводорослей *Ch. vulgaris*, *I. galbana* и *T. weissflogii* на микрофлору среды с экзогенно питающимися личинками. Этап экзогенного питания личинок наиболее проблематичен. В этот период в выростные ёмкости с личинками вносят их стартовый корм – коловраток, создавая оптимальное соотношение организмов личиноки : коловратки 30 экз.· л$^{-1}$: 3 экз.· л$^{-1}$. С начала питания личинок коловратками (рис. 4. 7) метаболи-

ческая нагрузка на среду резко увеличивается, происходит рост численности бактерий. Добавление в среду клеток микроводорослей с антибактериальным эффектом, с одной стороны позволяет снизить численность бактерий, а с другой может нарушить баланс организмов (личинки-коловратки), т.к. водоросли являются основной пищей *B.plicatilis.* Наличие дополнительного пищевого ресурса – микроводорослей, может повлечь за собой рост численности коловраток, что приведет к ещё большей бактериальной нагрузке.

Рис. 4. 7. Личинки калкана на этапе экзогенного питания коловратками

Решением проблемы, на наш взгляд, может быть использование фильтратов микроводорослей с антибактериальным эффектом. При наличии антибактериального эффекта у фильтратов, их использование позволит снизить численность бактерий в СВЛ, избежав при этом нежелательного размножения коловраток.

В эксперименте по определению наличия бактерицидного действия у фильтратов микроводорослей *Ch. vulgaris, I. galbana* и *T. weissflogii* было определено следующее. После добавления фильтратов в течение первых суток эксперимента бактериальный рост наблюдали во всех сосудах (рис. 4. 8). Однако уже через сутки численность бактерий в опыте с фильтратом *Ch. vulgaris* была достоверно ниже, чем в контроле. На вторые сутки эксперимента рост бактерий продолжался в экспериментальных сосудах с фильтратами *I. galbana* и *T. weissflogii*, тогда как в контроле и в опыте с *Ch. vulgaris* численность бактерий снижалась (рис. 4. 9). В опыте с филь-

тратом *Ch. vulgaris* численность бактерий на вторые сутки была также достоверно ниже, чем в контроле, что свидетельствовало о хорошо выраженных бактерицидных свойствах фильтрата.

Бактерицидное действие *I. galbana* и *T. weissflogii*, как самих клеток, так и их фильтратов в экспериментах не выявлено, несмотря на то, что об антибактериальном эффекте *I. galbana,* а так же о бактерицидных свойствах диатомовых водорослей сообщается в ряде работ [64, 149].

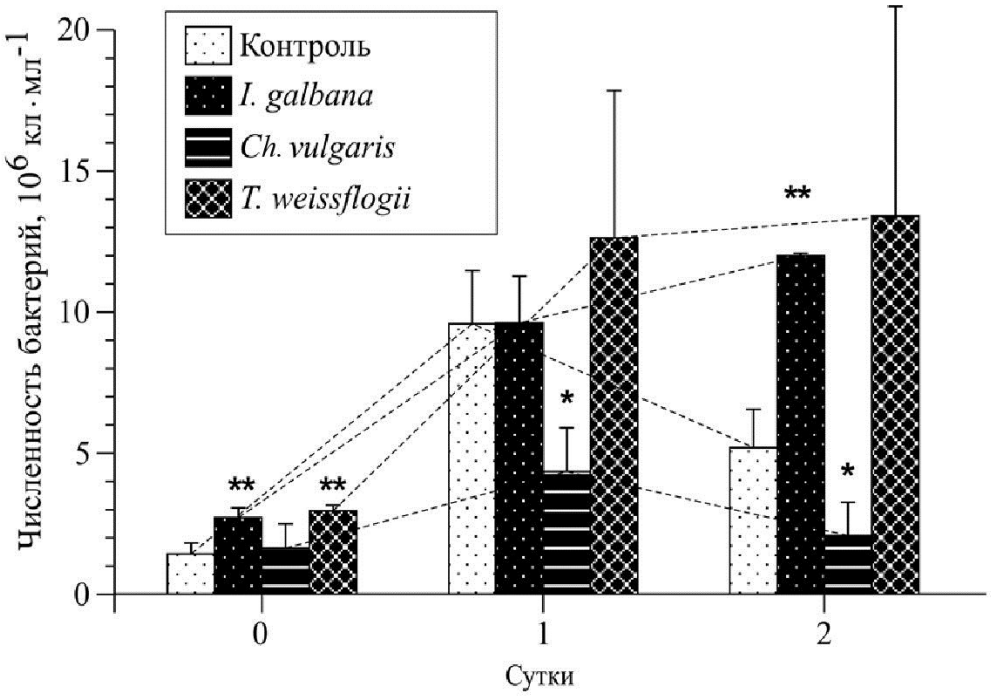


Рис. 4. 8. Динамика численности бактерий в сосудах с личинками на стадии экзогенного питания. Одна и две звёздочки – значения, соответственно, достоверно (p<0.05) ниже и выше контроля (t-тест Стьюдента)

Таким образом, из исследованных нами видов микроводорослей хорошо выраженным антибактериальным эффектом обладала только *Ch. vulgaris* и её фильтрат, в то время как бактерицидный эффект *I. galbana* не обнаружен.

С целью снижения численности бактерий в среде выращивания камбалы калкан добавление *Ch. vulgaris* целесообразно на всех исследованных стадиях развития калкана. Присутствие этого вида водорослей в среде с личинками на стадии эндогенного питания может предупредить бактериальную вспышку в момент перехода

личинок на стадию экзогенного питания. Показано, что бактерицидное действие фильтрата культуры *Ch. vulgaris* по своей эффективности сравнимо с действием нефильтрованной культуры. Приготовление фильтрата требует дополнительных затрат времени и расходных материалов, но они оправданы тем бактерицидным эффектом, который фильтрат оказывает на стадии экзогенного питания личинок калкана.

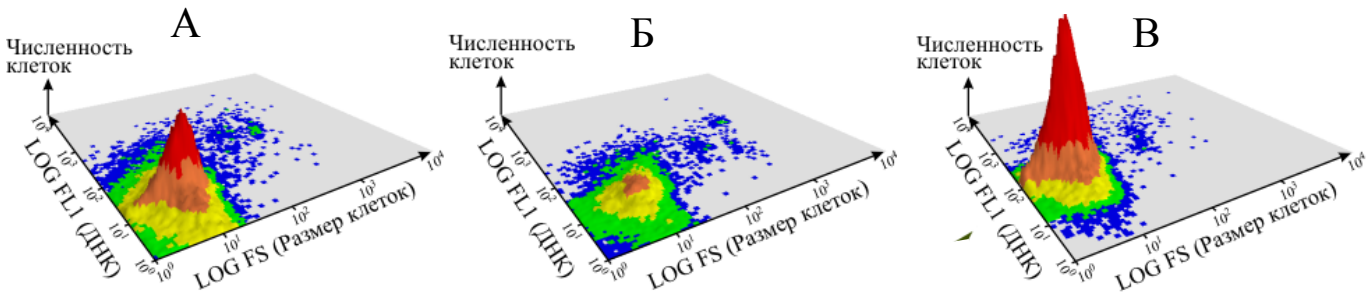


Рис. 4. 9. Кластер бактерий в 3-мерном представлении в контроле (А) и опытах с *Ch. Vulgaris* (Б) и *T. Weissflogii* (В) на вторые сутки эксперимента 3

4. 3. Влияние микроводоросли *Chlorella vulgaris* на динамику численности бактерий в среде выращивания артемии *Artemia salina* и интенсивность бактериальной колонизации покровов её науплиев

Артемия – один из основных КО камбалообразных, который часто является вектором передачи патогенных бактерий личинкам, что определяет необходимость снижения численности бактерий в её среде. С этой целью мы исследовали влияние микроводоросли *Ch. vulgaris*, антибактериальный эффект которой был выявлен в предыдущих экспериментах, на динамику численности бактерий в среде выращивания артемий. Кроме того была исследована интенсивность колонизации бактериями внешних покровов науплиев.

В начале эксперимента численность бактерий в контрольных сосудах без добавления микроводорослей была достоверно ниже ($\approx 0{,}3 \pm 0{,}17 \cdot 10^6$ кл·мл$^{-1}$), чем в сосудах с добавлением *Ch. vulgaris* ($\approx 2{,}1 \pm 0{,}17 \cdot 10^6$ кл·мл$^{-1}$) (рис. 4. 10 Б). Это обу-

словлено тем, что вместе с микроводорослями в среду были привнесены ассоциированные с ними бактерии.

В дальнейшем на протяжении всего эксперимента бактериальная численность увеличивалась во всех сосудах, что было обусловлено выклевом и поступлением в среду большого количества органических веществ, являющихся субстратом для бактерий. Однако в контроле бактериальное число значительно превышало таковое в экспериментальных сосудах и на момент пика выклева науплиев (20 ч) (рис 4. 10 А) составляло $66,7 \pm 4,4 \cdot 10^6$ кл·мл$^{-1}$ в контроле и $31,9 \pm 0,9 \cdot 10^6$ кл·мл$^{-1}$ в экспериментальных сосудах (рис 4. 10 Б). Необходимо также отметить, что после 20 ч инкубации артемий (пик выклева) рост бактерий в сосудах с добавлением *Ch. vulgaris* не только не увеличивался, а замедлился, в то время как в контрольных сосудах он продолжал увеличиваться и в конце эксперимента численность бактерий составила, соответственно, $82,7 \pm 14 \cdot 10^6$ и $33,6 \pm 0,12 \cdot 10^6$ кл·мл$^{-1}$, что указывает на хорошо выраженный антибиотический эффект данного вида микроводорослей.

Добавление *Ch. vulgaris* в среду инкубации артемии оказывало также положительный эффект и на динамику выклева науплиев. В сосудах с добавлением *Ch. vulgaris* выклев начинался раньше, и уже через 18 часов численность науплиев в опыте составляла 136 ± 2 экз.·мл$^{-1}$ и 75 ± 35 экз.·мл$^{-1}$ в контроле.

Известно, что сигналом к разрыву наружных оболочек цист артемий и освобождению науплиев от них являются специальные энзимы, которые выделяются в головной части эмбриона [147].

Можно предположить, что высокая численность бактерий в среде инкубации может негативно влиять на этот процесс. Вместе с тем, содержание кислорода в среде в присутствии микроводорослей увеличивается, что может оказывать положительный эффект на процесс выклева науплиев [147].

Пик выклева (максимальная численность науплиев) и в контрольных и в экспериментальных сосудах была зафиксирована через 20 часов, после чего наблюдали начало метаморфоза – появление метанауплиев – следующей стадии развития артемии, однако скорость метаморфоза в дальнейшем различалась (рис. 4. 10 А). В экспериментальных сосудах численность неметаморфизированных особей (науплиев)

снижалась в 1,3 раза быстрее, что указывает на то, что в отсутствии хлореллы процесс метаморфоза артемий проходил значительно медленнее. Так, через 25 часов количество науплиев в контроле составляло 118 ± 16 экз.·мл $^{-1}$, в то время как в опыте оно снизилось до 86 ± 14 экз.·мл $^{-1}$.

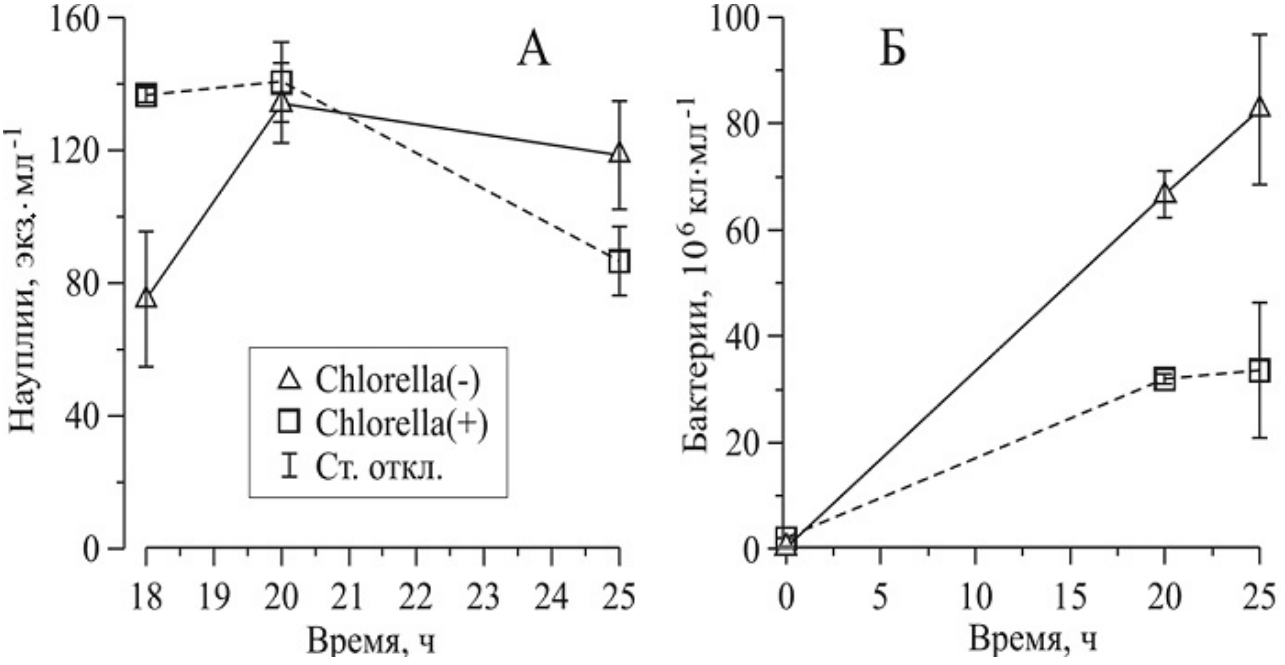


Рис. 4. 10. Динамика выклева науплиев *A. salina* (А) и бактериальной численности в их среде (Б) в контроле (Chlorella(-)) и в сосудах с добавлением *Ch. vulgaris* (Chlorella(+))

Таким образом, можно заключить, что присутствие *Ch. vulgaris* в среде инкубации артемий не только сокращает время выклева, но и обеспечивает их более синхронный метаморфоз. Это позволяет снизить расходы на инкубацию и дает возможность получить максимальное количество однородных организмов (определенной стадии развития), что очень важно, т.к различным стадиям развития личинок калкана, должны соответствовать определенные стадии развития артемии.

Во время метаморфоза происходит линька науплиев, что приводит к поступлению дополнительного количества органических веществ в среду инкубации, и, соответственно, росту бактериальной численности. Действительно, после пика выклева и начала метаморфоза в контрольных сосудах в отсутствие хлореллы числен-

ность бактерий растет, в то время как в экспериментальных сосудах в присутствии хлореллы – она изменяется незначительно (рис 4. 10 Б). Это указывает на то, что даже в условиях поступления дополнительного субстрата для роста бактерий в среду *Ch. vulgaris* сохраняет свою антимикробную активность и сдерживает рост бактерий.

Антимикробный эффект хлореллы был отмечен нами в ряде экспериментов, где было выявлено, что присутствие хлореллы снижало численность бактерий в среде на различных стадиях развития личинок калкана [39]. Об антимикробной активности микроводорослей неоднократно сообщалось в других публикациях [78]. Предполагают, что она может быть связана с действием метаболитов, продуцируемых клетками микроводорослей [110] или специфической бактериальной флорой, ассоциированной с культурами микроводорослей [98]. В естественной среде обитания микроводоросли конкурируют с бактериями за ограниченное пространство и ресурсы [101], что определяет способность многих видов микроводорослей к синтезу антибиотиков и хорошо выраженному ингибированию бактериального роста [1].

В ходе эксперимента было также установлено, что присутствие хлореллы влияло на степень и характер колонизации покровов артемии бактериями. Окрашенная SYBR Green I бактериальная пленка на покровах науплиев артемии флуоресцировала ярко зеленым цветом. По локализации и яркости флуоресценции определяли интенсивность бактериальной колонизации той или иной области цефалоторакса (рис. 4. 11).

В наибольшей степени бактерии колонизировали протоцефалон и конечности науплиев (рис. 4.11 В), однако отдельные небольшие очаги бактериальной пленки наблюдали также и на других участках покровов тела артемий (рис. 4. 11 С). Особи, наиболее интенсивно колонизированные бактериями, существенно отличались по своим средним цветовым характеристикам, в первую очередь, по яркости свечения (B) и вкладу зеленого цвета (G) в общую цветовую гамму покровов организма. Таким образом, осредненные значения яркости окраски и её зеленой компоненты могли служить достоверным показателем степени колонизации покровов артемии бактериальной флорой среды выращивания.

В наибольшей степени бактерии колонизировали протоцефалон и конечности науплиев (рис. 4. 11 B), однако отдельные небольшие очаги бактериальной пленки наблюдали также и на других участках покровов тела артемий (рис. 4. 11 C). Особи, наиболее интенсивно колонизированные бактериями, существенно отличались по своим средним цветовым характеристикам, в первую очередь, по яркости свечения (B) и вкладу зеленого цвета (G) в общую цветовую гамму покровов организма. Таким образом, осредненные значения яркости окраски и её зеленой компоненты могли служить достоверным показателем степени колонизации покровов артемии бактериальной флорой среды выращивания.

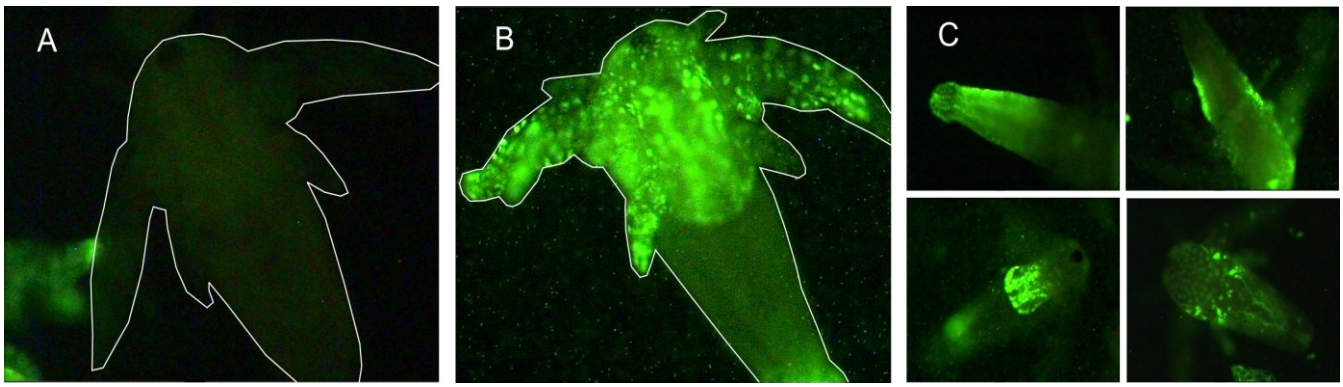


Рис. 4. 11. Флуоресценция бактериальной пленки на покровах артемии после окраски пробы SYBR Green I: A – отсутствие бактериальной колонизации, B – сильная бактериальная колонизация головы и конечностей, C – примеры разной локализации бактерий на покровах артемии

В пробах с хлореллой (Chlorella(+)) степень колонизации артемий бактериями была ниже, чем в контроле (Chlorella(−)) (рис. 4. 12). В пространстве переменных G и B обе пробы образуют в значительной степени перекрывающиеся кластеры точек (рис. 4. 12 A), однако кластер контроля крупнее, поскольку он включает колонизированные бактериями организмы с ярко-зеленой флуоресценцией (рис. 4. 13).

Распределение каждой из выборок по переменной G представлено на рис. 4. 12 Б в форме диаграмм Box-Whisker (медиана, диапазон изменений, верхний и нижний квартили, выбросы). Для этой переменной получена статистически достоверная разница между опытом и контролем ($p<0.05$, непарный *t*-тест), что указывает

на хорошо выраженный бактерицидный эффект хлореллы и указывает на возможность её использования для снижения риска передачи бактериальных патогенов через живые корма.

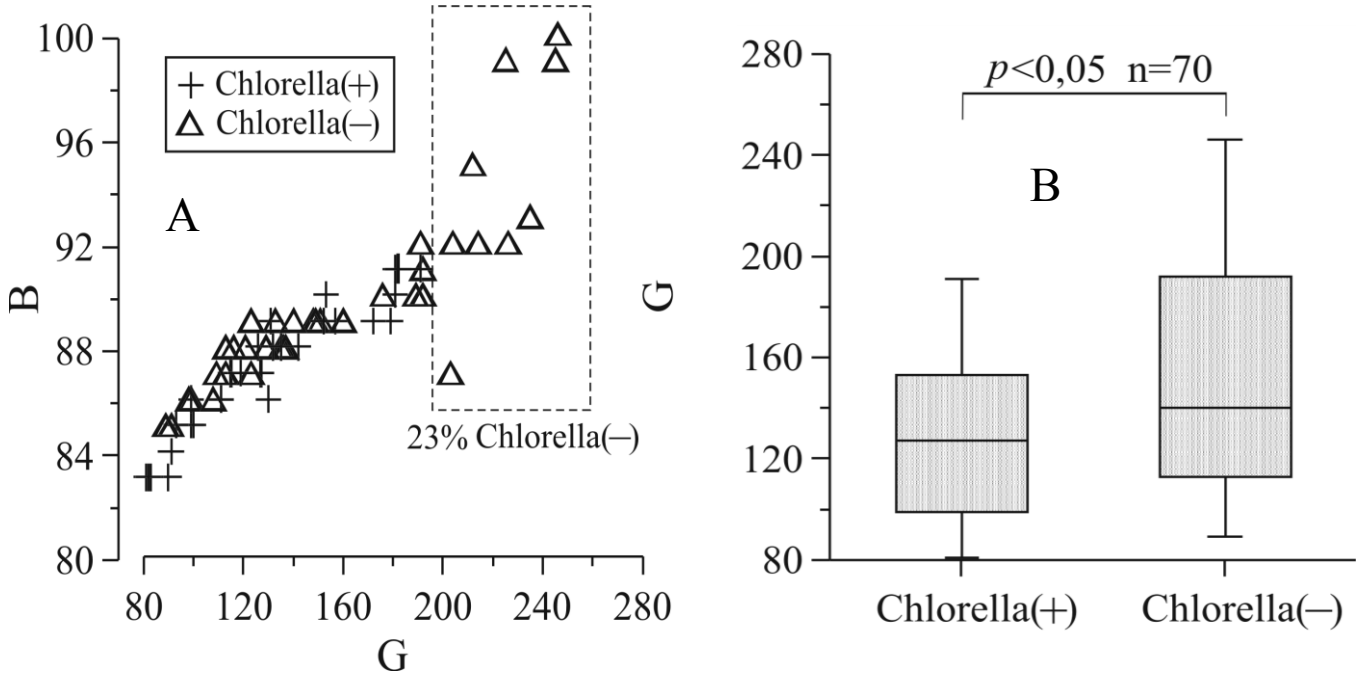


Рис. 4. 12. Оценка степени бактериальной колонизации покровов науплиев артемии в обработанных хлореллой пробах (Chlorella(+)) и контроле (Chlorella(−)) по характеру окраски (G – зелёная компонента RGB, B – яркость в цветовой модели HSB) бактериальной биопленки флуорохромом SYBR Green I

Характер распределения кластеров на рис. 4. 12 А позволяет сделать ряд предположений о механизме выявленного эффекта. Высокие концентрации бактерий (в том числе патогенных) в среде контроля увеличивают вероятность заражения организмов с ослабленным иммунитетом, которые всегда присутствуют в популяции (эта часть популяции выделена пунктиром на рис. 4. 12 А и составляет около 23%).

В целом, устойчивость организмов к бактериальной колонизации покровов и эпителия обусловлена их иммунно-физиологическим статусом [86]. Иммунная система артемии примитивна, антитела ею не вырабатываются, однако этот организм способен демонстрировать неспецифический иммунный ответ. Как показано в ряде

работ [71, 100, 147], хлорелла усиливает неспецифический иммунитет у личинок рыб и кормовых объектов аквакультуры.

Наряду с модулированием иммунитета артемии и антимикробным эффектом, описанным выше, хлорелла может оказывать ингибирующее действие на некоторые биохимические механизмы, протекающие в процессе образования биопленки на поверхности организмов, такие, например, как кворумная сигнализация [83].

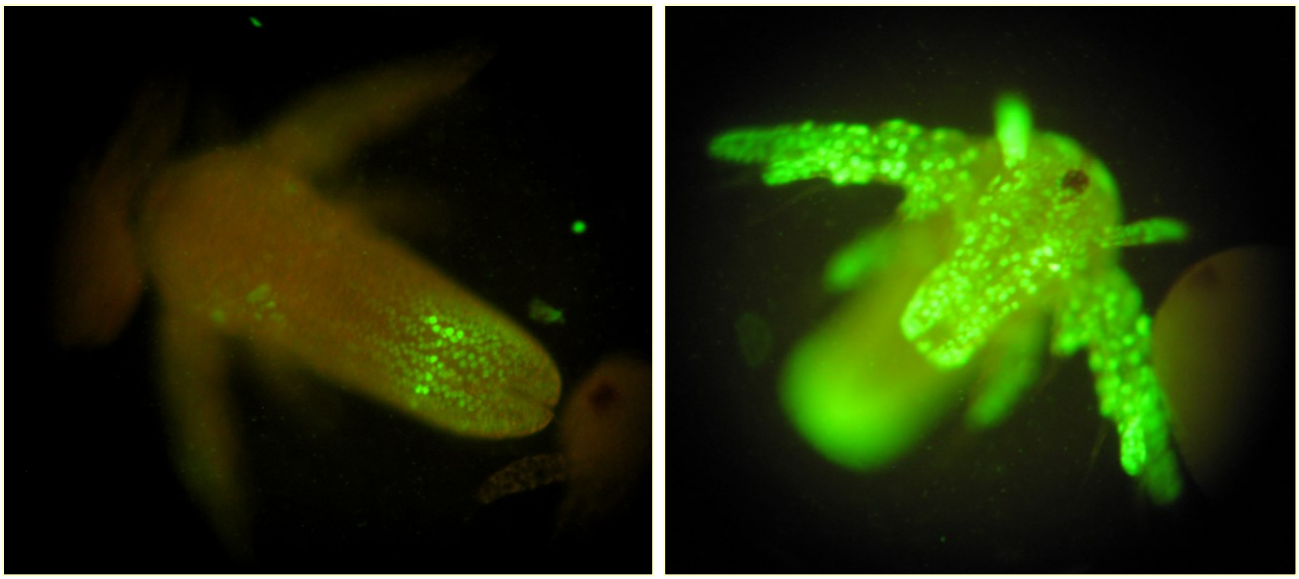


Рис. 4. 13. Науплии артемии колонизированные бактериями незначительно (А) и с ярко-зеленой флуоресценцией (особи, встречающиеся в контроле) (Б) (фото автора)

Биопленки являются наиболее распространенной формой выживания микробов в агрессивной среде и представляют собой совокупность бактерий, взаимодействующих друг с другом, с поверхностью субстрата. Они окружают себя полимерным конгломератом, состоящим из внеклеточной ДНК, белков, полисахаридов [91]. Рост биопленки влечет за собой повышенную резистентность составляющих ее бактерий к санирующим воздействиям (антибиотики, антисептики).

Взаимодействие бактерий происходит посредством кворумной сигнализации (QS) от англ. quorum sensing - коммуникации бактерий, координирующей экспрессию генов в зависимости от условий внешней среды и плотности бактерий на субстрате. QS осуществляется с помощью сигнальных молекул, вырабатываемых бак-

териями. Эти молекулы обеспечивают привлечение новых бактерий в растущую биопленку и стимулируют дальнейшее деление уже закрепленных в ней [75]. Наиболее изученным типом этих сигнальных молекул на сегодняшний день является ацил-гомосерин лактон (AHL) [63]. Именно AHL регулирует фактор вирулентности бактерий. В ряде исследований установлено, что соединения, которые вырабатывают некоторые виды микроводорослей, в частности *Ch. vulgaris*, способны ингибировать выработку этих молекул, а также экспрессию генов некоторых штаммов бактерий, входящих в состав биопленки [75, 83], сдерживая, таким образом, её формирование.

Независимо от тонких механизмов, лежащих в основе антимикробного эффекта оказываемого хлореллой, его практическое использование в борьбе с патогенными бактериями в аквакультуре представляется перспективным.

Таким образом присутствие *Ch. vulgaris* в среде инкубации *A. salina* оказывало ингибирующий эффект на бактериальный рост, сопутствующий выклеву науплиев и положительно влияло на динамику их выклева (сокращение времени выклева, более синхронный метаморфоз животных). Интенсивность обрастания артемий бактериальной пленкой также была достоверно ниже в присутствии клеток *Ch. vulgaris.* Полученные результаты позволяют считать целесообразным применение хлореллы в качестве эффективного антимикробного агента и рассматривать данный вид как перспективный и непременный компонент биотехнологического комплекса выращивания личинок морских рыб.

4. 4. Динамика численности бактерий в среде инкубации икры и интенсивность бактериальной колонизации её поверхности при различных методах обработки

При исследовании динамики численности бактерий в среде инкубации икры (СИИ) и интенсивности бактериальной колонизации (ИБК) её поверхности при различных методах обработки с целью снижения бактериальных контаминаций: озонирование, добавление в среду микроводорослей с бактерицидным эффектом

Ch. vulgaris, было определено, что и озон, и хлорелла оказывали ингибирующее действие на бактерий в СИИ, однако в разных временных диапазонах.

Ингибирующий эффект хлореллы начал проявляться после трёх суток. Он выражался в более низком количестве бактерий в среде инкубации икры с добавлением хлореллы по сравнению с контролем (рис. 4. 14).

В экспериментальных сосудах с озоном ингибирующий эффект был ярко выражен в период первых по третьи сутки, затем численность бактерий начала расти. В контроле рост численности бактерий начался уже с первых суток и продолжал расти на протяжении всего эксперимента (рис. 4. 14).Таким образом, модели бактериального роста в СИИ (О), (Х) и (К) были различны (см. кривые на рис. 4.14). В СИИ (К) и СИИ (О) наблюдали экспоненциальный рост без (контроль) и с лаг-фазой (Озон), соответственно. Наличие лаг-фазы в СИИ (О) было обусловлено массовой, неселективной гибелью микроорганизмов и коллапсом микробного сообщества после обработки пробы озоном. По этой же причине удельная скорость роста бактерий в СИИ (К), где лаг – фазы не наблюдали, была выше в первые сутки, чем в СИИ (О). Со вторых суток эксперимента величины μ были максимальны в опыте с озоном вследствие низкой начальной численности бактерий, избытка ресурсов для роста и наличия свободных трофических ниш. Начальная численность бактерий была максимальна в СИИ (Х), однако её прирост в последующие сутки был менее выражен, чем в СИИ (К) и (О). Более того, динамика численности бактерий в СИИ (Х) отвечала модели роста с насыщением, что свидетельствовало о достижении сообществом устойчивого (климаксного) состояния, которое характеризовалось высокой степенью специализации трофических ниш, их заполненностью, снижением конкуренции и оптимальным использованием ресурсов. На высокий потенциал роста бактерий в СИИ (О), указывают также данные, полученные при анализе удельной скорости роста бактерий на среде М65 (μ_{M65}). Величина μ_{M65} в данном случае позволяла сравнивать пробы по активности быстрорастущих видов бактерий, т.е. *r* – стратегов. При анализе показателя μ_{M65} мы руководствовались постулатами теории *r/K* отбора, которая определяет две различные природные стратегии размножения живых организмов, при определённых обстоятельствах.

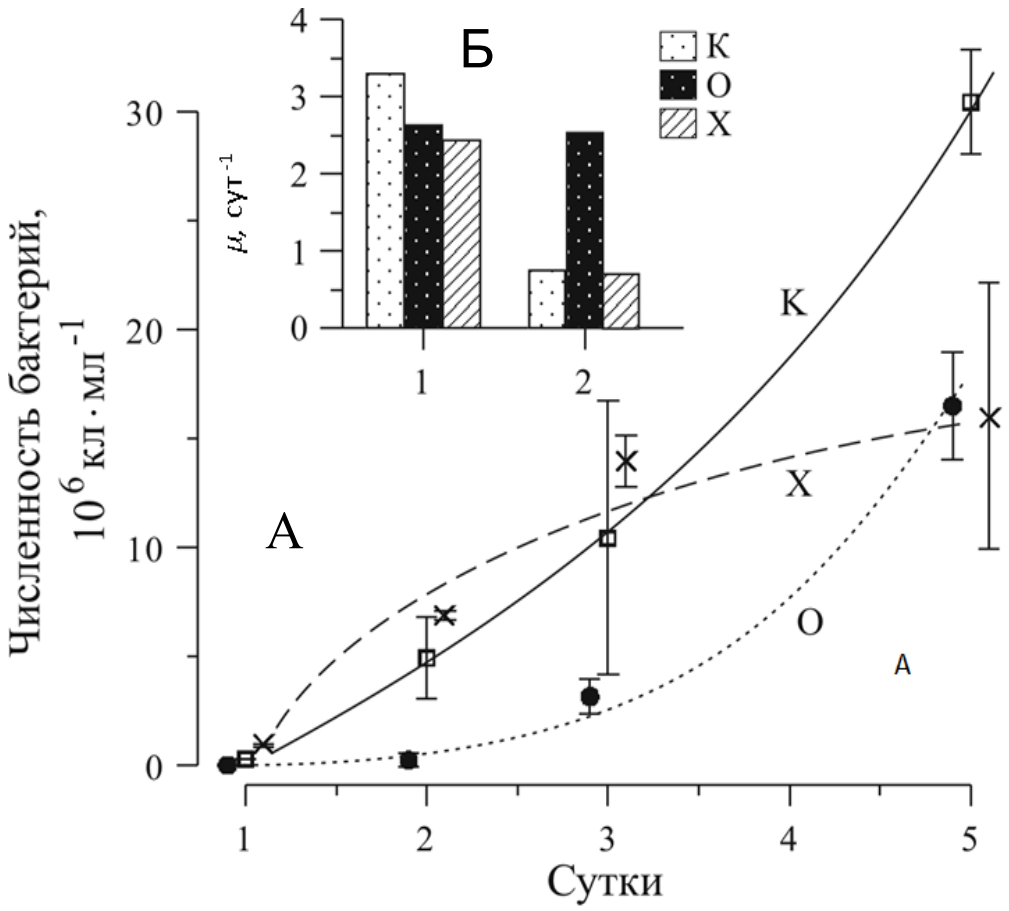


Рис. 4. 14. Динамика численности бактерий (А) и удельная скорость их роста (Б) в средах инкубации икры: в контроле (К), после обработки среды озоном (О) и при добавлении в среду хлореллы (Х)

Согласно первой в нестабильной окружающей среде преобладает *r*-стратегия, ключевую роль, в данном случае, играет способность организмов к быстрому размножению, а адаптационные механизмы, позволяющие конкурировать с другими организмами, ввиду быстро изменяющихся условий не столь важны. Характерными чертами r-стратегии являются небольшие размеры, относительно короткое время жизни и способность к быстрому размножению [109].

Если окружающая среда относительно постоянна, то в ней преобладают организмы с *K*-стратегией, так как в этом случае на первое место выходит способность успешно конкурировать с другими организмами в условиях ограниченных ресурсов. Характерными чертами *K*-стратегии являются крупные размеры, более длительный

жизненный цикл, устойчивость к изменениям условий среды [109]. Подобное теоретическое деление организмов, сформулированное в *r/K* концепции, применимо и к микроорганизмам [55]. Доминирование в бактериальном сообществе *r* или *K* стратегов, является крайними точками его развития, т.е. в среде присутствуют и те и другие, а *r*- и *K*-стратеги преобладают в развивающихся или климаксных сообществах [118].

Среди быстрорастущих бактерий (*r*-стратегов) велика доля видов-оппортунистов [54], которые представляют собой потенциальную угрозу объектам марикультуры, оказывая прямое (патогены и болезни, ими вызываемые) или косвенное (токсичность метаболитов, снижение кислорода в среде, биообрастание и др.) негативное влияние на их состояние и развитие [44].

Самые высокие показатели μ_{M65} наблюдали в СИИ (О) (рис. 4. 15), что указывает на присутствие в бактериальном сообществе данной среды большого количества *r*- стратегов - бактерий оппортунистов. Согласно *r/K* теории оппортунистические бактерии в условиях нарушения баланса бактериальных сообществ, т.е. низкого уровня конкуренции и большого количества питательных веществ, становится доминантами [136]. Можно предположить, что именно такая ситуация произошла в СИИ (О). Присутствие в среде озона приводило к элиминации большого числа бактерий, о чем свидетельствует самая низкая их численность в СИИ (О) относительно СИИ (К) и СИИ (Х) в начале эксперимента (рис. 4. 14 А). В условиях отсутствия конкуренции в СИИ (О) оппортунистические бактерии, которые были привнесены в среду вместе с икрой, быстро размножились. Таким образом, высокая удельная скорость роста бактерий в среде инкубации и на среде М 65 указывают на доминирование в СИИ (О) оппортунистической микрофлоры. Обратную ситуацию наблюдали в СИИ (Х). Низкие показатели μ и μ_{M65} и сравнительно большой объём бактериальных клеток указывают на то, что бактериальное сообщество СИИ (Х) находится в состоянии равновесия, для которого характерно присутствие *K* – стратегов [118]. Микрофлора среды, представленная *K* – стратегами играет важную роль и может являться неспецифическим защитным механизмом икры и личинок, препятствуя развитию патогенной микрофлоры.

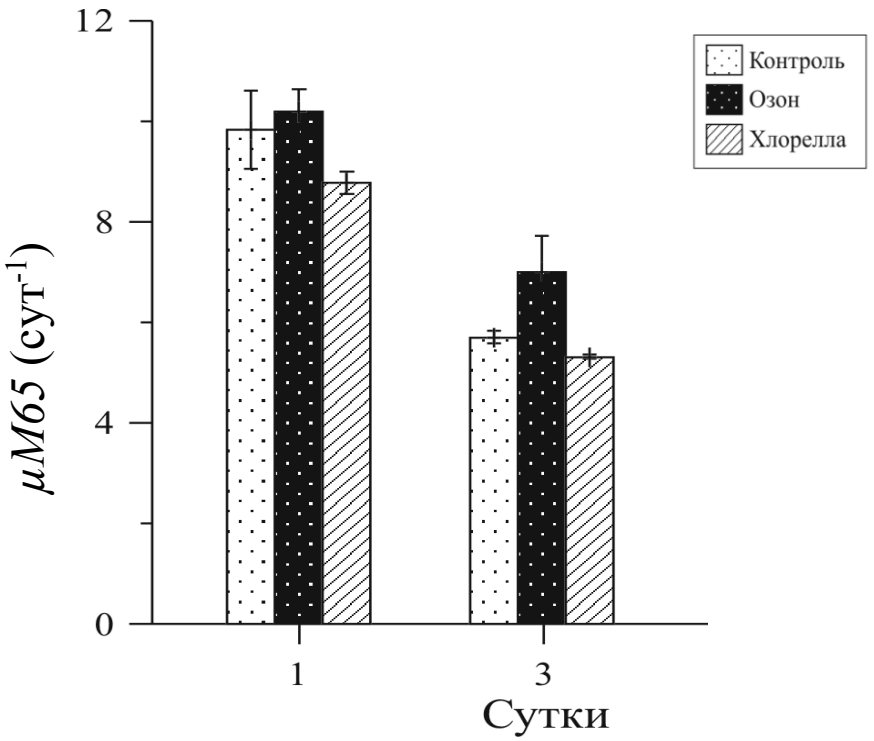


Рис. 4. 15. Удельная скорость роста (μ_{M65}) бактерий из среды инкубации икры (К, О, Х) на жидкой питательной среде М65 на 1 и 3 сутки эксперимента

Дальнейшие исследования интенсивности колонизации икры бактериями в процессе инкубации хорошо согласуются с вышеизложенным. Интенсивность бактериального обрастания икры в СИИ (К) и (О) значительно возрастала в первые сутки эксперимента (рис. 4. 16), увеличивалось количество экземпляров с высокой степенью бактериальной колонизации (экстремумы на диаграммах Вискера, рис. 4. 16). На вторые сутки, наоборот, происходило снижение индекса до величин, наблюдаемых в начале эксперимента, что было связано с высокой смертностью (отходом) икры, которая была подвержена наибольшей колонизации бактериями. При этом в СИИ (О) по-прежнему присутствовали экземпляры с высоким индексом I_b, что указывало на возможность увеличения отхода икры в этой пробе. Таким образом, была косвенно отмечена связь между индексом бактериальной колонизации икры и её смертностью, независимо от того, является ли бактериальное обрастание причиной гибели икры или, наоборот, следствием её деградации по иным причинам.

В отличие от контроля и озонированной пробы, в СИИ (Х) происходило постоянное снижение медианы и вариабельности I_b, хотя и присутствовали экземпля-

ры с высокой степенью бактериального обрастания (наличие экстремумов в первые сутки, рис. 4. 16).

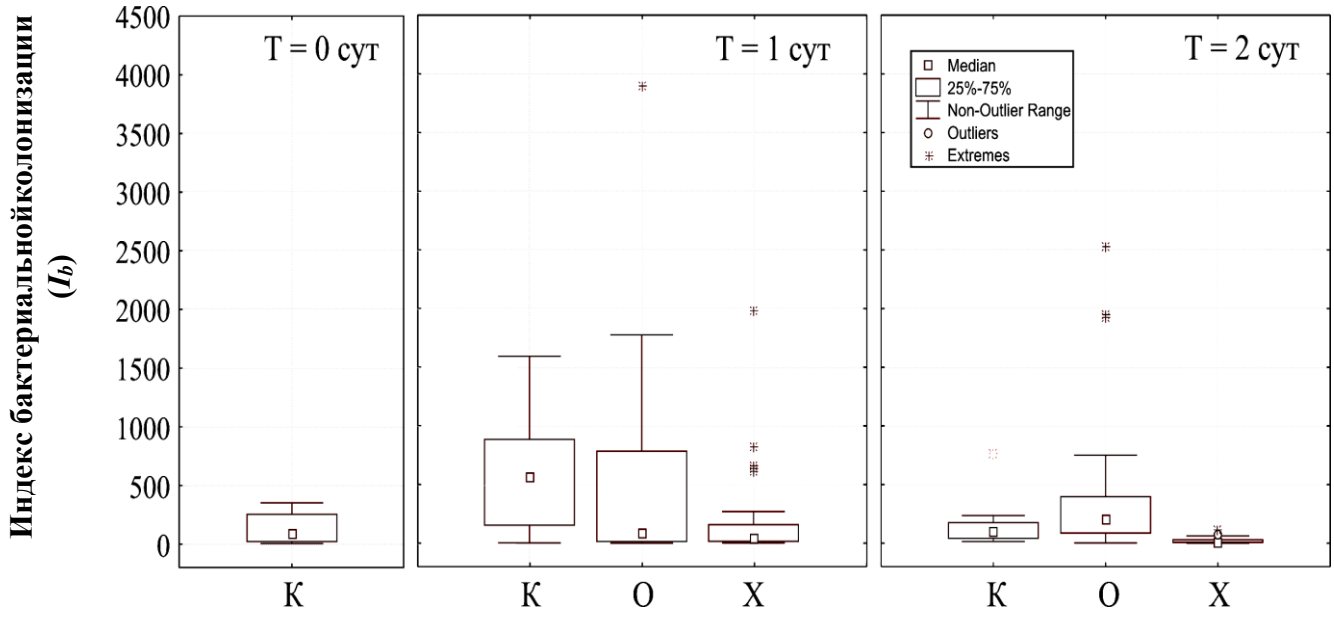


Рис. 4. 16. Индекс бактериальной колонизации (I_b) поверхности икры в контроле (К), после обработки среды озоном (О) и при добавлении хлореллы (Х)

Подобный результат может указывать на наличие некоторого фактора, связанного с присутствием хлореллы и оказывающего ингибирующий эффект на процессы бактериальной колонизации поверхности икры. Действие этого фактора продолжалось и после выклева личинок. На 4-ые сутки (начало выклева личинок) в сосудах СИИ (О) в условиях высокой численности бактерий были отмечены особи, у которых хвостовая область была значительно колонизирована бактериями (рис 4. 17). В сосудах с СИИ (Х) таких экземпляров не наблюдали.

Таким образом, можно предположить, что высокие показатели μ бактерий в СИИ (О) на среде М65 являются следствием нарушения баланса в бактериальном сообществе после однократного озонирования среды. То есть его применение вызывало селективный рост оппортунистических бактерий, чего не происходило в СИИ (Х), в которую вместе с клетками микроводорослей были привнесены ассоциированные с ними бактерии. Вероятно ингибирующий эффект хлореллы, выявленный

при анализе интенсивности бактериальных обрастаний связан именно с аутентичной микрофлорой *Ch. vulgaris*.

Рис. 4. 17. Колонизация бактериями хвостового отдела личинки калкана из СИИ (О) в первые сутки после выклева в световом (А) и люминесцентном (Б) режимах микроскопа (фото автора)

Исходя из полученных нами данных можно заключить, что озон, действительно эффективно снижает численность бактерий в СИИ, однако его действие кратковременно и провоцирует развитие оппортунистической микрофлоры. Для поддержания низкой численности бактерий в среде необходимо проводить повторные обработки СИИ озоном и обеспечить поддержание низкого уровня метаболитов в среде – основного субстрата для роста бактерий. Это может быть достигнуто своевременной сменой воды – организацией проточного режима, совмещаемым с кратковременной остановкой и выдерживанием икры в течение некоторого времени в воде с добавлением хлореллы для снижения ИБК поверхности икры.

Методы снижения бактериальной нагрузки можно комбинировать. На первом этапе - промывать икру озонированной водой, редуцируя, таким образом, численность бактерий на её поверхности, на более поздних этапах - добавлять в среду инкубации икры *Ch. vulgaris*. Такая комбинация двух методов позволит создать в среде

инкубации икры оптимальные микробиологические условия для её развития, снизив интенсивность бактериальной колонизации поверхности икры.

РАЗДЕЛ 5

ПОДГОТОВКА МОЛОДИ ЧЕРНОМОРСКОГО КАЛКАНА К ВЫПУСКУ В ЕСТЕСТВЕННЫЕ МЕСТА ОБИТАНИЯ

Основным фактором, обеспечивающим высокую выживаемость искусственно выращенной метаморфизированной молоди калкана при зарыблении, является её предварительная адаптация к условиям естественных мест обитания. Подготовка мальков к выпуску в море должна включать в себя как усиленное сбалансированное питание для увеличения скорости роста, наращивания мышечной ткани и повышения иммунитета калкана перед выпуском, так и выработку поведенческих реакций молоди к физическим (грунт, температура и т. д.) и трофическим (определенный спектр естественных жертв) условиям предполагаемых мест выпуска. Разработка эффективных методов адаптации требует данных о некоторых эколого-физиологических и поведенческих особенностях калкана.

Исследования, направленные на разработку принципов адаптации молоди калкана к выпуску в естественные места обитания, включали в себя несколько направлений.

5. 1. Оценка калорийности и усвояемости различных кормов молодью калкана

Корма, применяемые в аквакультуре. Полученные данные дают возможность оценить экспериментальные виды корма и рассмотреть перспективу и область их дальнейшего использования.

1) Фарш кальмара: высокое содержание белка определяет ценность данного вида корма, поскольку белок необходим для формирования мышечной массы и нормального роста молоди. Определено, что мясо кальмара имело наиболее высокую калорийность из всех исследованных кормов - 5,2 кал·мг$^{-1}$ и высокую степень

усвояемости молодью калкана – 63,5 %. Таким образом, кальмар может являться одним из основных составляющих в рационе молоди калкана.

2) Мясо ставриды менее калорийно по сравнению с мясом кальмара - 3,7 кал·мг$^{-1}$, но его усвояемость достаточно высока – 60,2 %. Отмечено, что мальки калкана проявляли более выраженный интерес к данному виду корма, что в дальнейшем может позволить регулировать объем кормления. Высокий процент усвояемости ставриды молодью калкана, низкая себестоимость, доступность и соответствие данного вида корма естественному спектру питания калкана определяет целесообразность его введения в рацион молоди готовящейся к выпуску.

3) Калорийность метанауплиев артемий составила – 3,4 кал·мг$^{-1}$, а усвояемость данного вида корма молодью калкана – 72,5 %, т.е. была самой высокой из всех предложенных экспериментальных кормов (табл. 5.1). Учитывая малые размеры артемии, её применение в качестве корма на данном этапе развития калкана нетехнологично. Однако высокие показатели усвояемости данных организмов молодью калкана позволяют использовать их в качестве транспортного средства, с помощью которого в рацион молоди можно вводить ферменты, витамины, медикаменты и т.д., что при использовании инертных размороженных кормов крайне затруднительно.

Таблица 5. 1

Калорийный состав предложенных видов корма, фекальных масс и процент усвояемости

Наименование корма	Корм		Фекалии		Усвояемость
	кал·мг$^{-1}$	SD	кал·мг$^{-1}$	SD	%
Кальмар	5,2	0,4840	1,9	0,4239	63,5
Ставрида	3,7	0,3666	1,5	0,5309	60,2
Артемия	3,4	0,5327	0,9	0,4652	72,5
Копеподы	3,9	0,5298	1,6	0,2334	58,8
Нереис	4,7	0,8232	2,2	0,4061	52,3
Гаммарус	2,8	0,1618	1,4	0,5178	50,1

Корма из естественных мест обитания калкана. Самым калорийным из предложенных естественных кормов является нереис - 4,7 кал·мг$^{-1}$, но степень его усвояемости не столь высока – 52,3 %, что связано с тем, что покров нереиса содержит много хитина, который не усваивается мальками, и зольность нереиса составляет около 12 % на сухое вещество [1]. Наиболее высокая усвояемость среди предложенных естественных кормовых объектов получена для копепод – 58,8 %, несмотря на их более низкую, чем у нереиса, калорийность – 3,9 кал·мг$^{-1}$. По-видимому, более высокая усвояемость копепод по сравнению с нереисами обусловлена более низкой зольностью первых – в пределах 5 - 9 % [105]. Самая низкая калорийность из трех естественных кормов оказалась у гаммарид - 2,8 кал·мг$^{-1}$, т.к. они обладают мощным хитиновым покровом, и их зольность составляет около 23,5 % [19]. Этим также можно объяснить самый низкий показатель усвояемости гаммаруса - 50,1 %. В целом, более низкая усвояемость естественных кормовых объектов по сравнению с искусственными объясняется низкой зольностью последних.

Таким образом, определено, что все исследуемые виды корма усваиваются молодью калкана более чем на 50%, и их можно рекомендовать к использованию в комплексном кормлении подготавливаемой к выпуску молоди калкана.

5. 2. Оценка избирательности гаммарид молодью черноморского калкана

При оценке поведенческих реакций и избирательности гаммарид молодью черноморского калкана было определено следующее:

В начале эксперимента мальки калкана охотились на самых крупных жертв - гаммарид группы С, однако попытки оказывались нерезультативными и спустя 2 часа они начинали охотиться на гаммарид групп А и В, скорость перемещения которых была сопоставима со скоростью их атак. Визуальные наблюдения подтверждены результатами расчетов. Для совокупной выборки мальков калкана показатели элективности колебались в пределах от 0,098 до 0,185 (для группы гаммарид А), от - 0,159 до - 0,111 (для группы В) и от –0,951 до –0,749 (для группы С). Для выборки

мальков с длинной тела SL = 2.1-2.6 см показатели элективности гаммарид составили 0,142; - 0,129; - 0,871 для гаммарид групп А, В, С, соответственно. Для выборки мальков с SL = 2,8- 3,0 см, значения элективности составили 0,157; 0,159; 0,831 для гаммарид групп А, В, С, соответственно. Для всех особей калкана наиболее высокие значения избирательности получены для гаммарид наименьших размеров. В группе мальков калкана с длинной тела SL = 2,1 - 2,6 см наблюдали отсутствие интереса к более крупным жертвам.

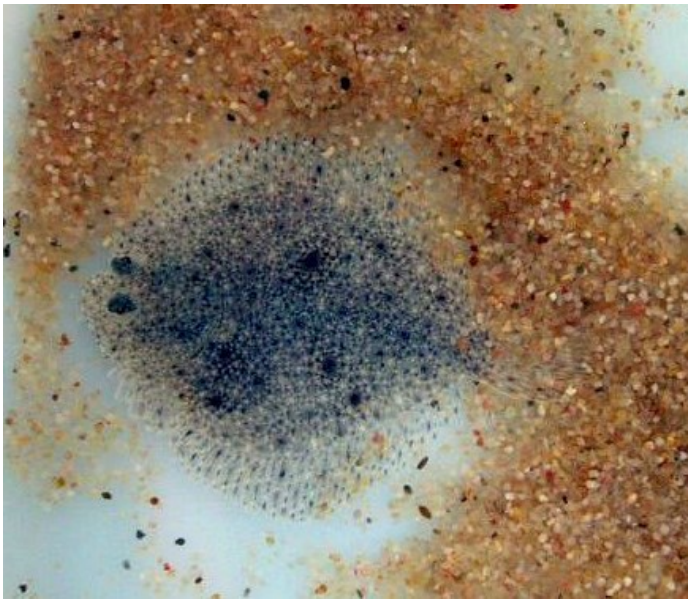
Таким образом, данные экспериментов свидетельствует о том, что избирательность гаммарид молодью калкана длиной тела 2,1-3,0 см связана не только с размером кормовых организмов, но и с их доступностью по скорости передвижения. Результаты данного исследования предлагается использовать при выборе районов выпуска искусственно выращенной молоди калкана.

5. 3. Влияние субстрата на поведение искусственно выращенной молоди черноморского калкана

В ходе работы, наблюдали значительное различие в характере поведения в группах мальков в присутствии (А) и отсутствии песчаного грунта (Б). В отсутствии песка мальки проводили световой день в чередовании плавания в толще воды и пребывания на дне емкости (примерно в равном соотношении времени). Их пигментация оставалась неизменной в течение всего эксперимента.

При адаптации к песчаному грунту первые 2 - 3 часа мальки проводили в толще воды, не опускаясь на субстрат. Затем они начинали опускаться на песок, не изменяя окраску. Первые изменения пигментации мальков в группе (А) начинали происходить через 5 ч после начала эксперимента, а через 12 ч их окраска уже приближалась к цвету субстрата (рис 5. 1). Первые попытки зарыться в грунт у мальков наблюдали через сутки после начала адаптации, при этом они лишь незначительно погружали в песок периферические части тела. Через двое суток большую часть времени мальки проводили, наполовину зарывшись в грунт. Только через неделю

мальки калкана быстро и результативно зарывались в песок целиком, камуфлируя цвет поверхности тела под цвет грунта. Полная идентичность оттенка пигментации мальков цвету субстрата произошла через две недели после начала адаптации.



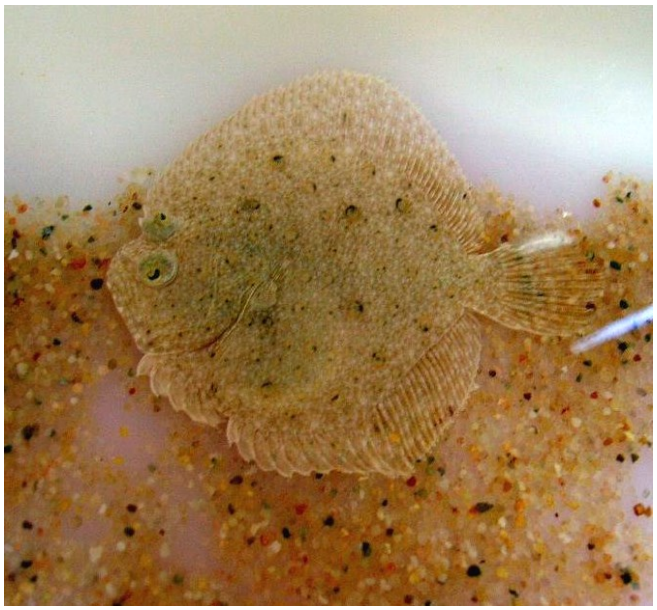


Рис. 5. 1. Пигментация мальков через час (А) и через 12 часов (Б) после внесение субстрата

Пищевое поведение (реакция на корм, характер и результативность атак) мальков в присутствии и отсутствии грунта также значительно различалось. В отсутствии песка мальки не реагировали на внесение незнакомого корма в течение первых 15 мин, затем пытались атаковать. Мальки преследовали жертву в толще воды, редко опускаясь на дно. Количество атак, заканчивающихся поимкой жертвы, составило 75 %. В течение первых суток этой группой мальков было съедено около 30 % внесенных мальков атерин.

Мальки, содержавшиеся в емкости с субстратом, реагировали на незнакомый корм сразу же после его внесения, и до 90 % их атак были результативны. В течение первого часа этой группой мальков было съедено 70 % внесенных мальков атерины.

По-видимому, высокая скорость поимки жертв у адаптированных к грунту мальков связана с характером атак: они подплывали к жертве, не отрываясь от грунта, затем производили резкие вертикальные атаки, после чего сразу же опускались на дно и зарывались (рис. 5. 2 А). В ёмкости без субстрата мальки охотились в толще воды, редко опускаясь на дно (рис. 5. 2 Б). Скорость атак мальков из этой группы была низкой, и они были менее результативны.

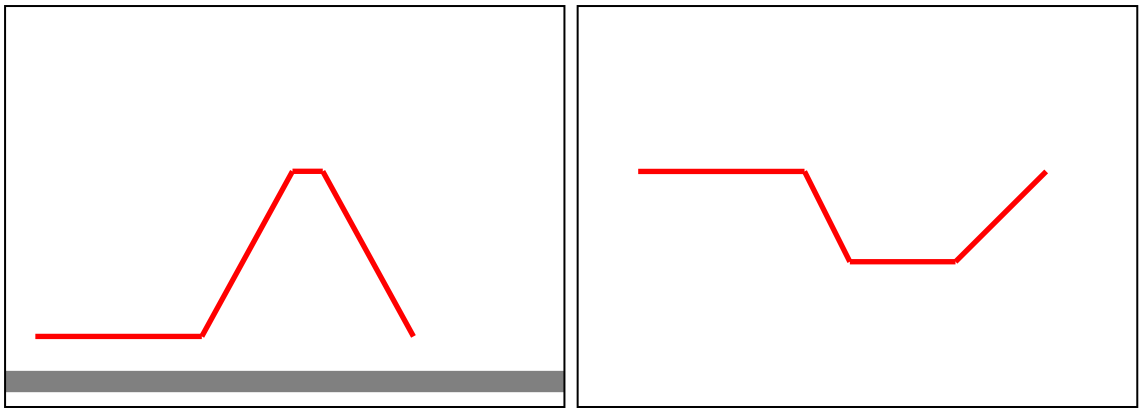


Рис. 5. 2. Характер атак молоди калкана относительно дна в ёмкости с грунтом (А) и без грунта (Б)

При повторном внесении уже знакомых малькам калкана живых кормов (атерины) в смеси с незнакомыми (морские иглы) в группах А и Б пищевое поведение мальков также было различно. В емкостях без субстрата мальки охотились сначала на малоподвижные жертвы – игл, 100 % которых было съедено в течение нескольких часов. Но мальки атерины сравнительно легко уходили от преследования незамаскированного хищника, и спустя сутки их осталось 46 % от внесенного количества. Напротив, в присутствии песчаного грунта 54 % от общего количества внесенных атерин было съедено мальками калкана уже через 10 мин после внесения, и 100 % - в течение 12 ч. Практически неподвижные, малозаметные на грунте, мальки игл остались не съеденными.

По результатам наших экспериментов можно заключить, что, несмотря на то, что искусственно выращенные мальки с самого начала содержались без субстрата (2,5 месяцев), мотивация к зарыванию и маскировке у них сохранилась, что говорит

об инстинктивных механизмах такого поведения. Однако для успешной реализации всех адаптационных возможностей калкана, заложенных генетически, необходим навык и тренировка, приобретаемые в течение определенного времени.

При повторном внесении атерины атаки калкана были более результативны, так как произошла адаптация к кормовому объекту. У мальков калкана, адаптированных к субстрату, частота, скорость и результативность атак на активную жертву была значительно выше, чем у мальков, содержащихся в емкостях без субстрата. Таким образом, предварительная адаптация к субстрату развивает у мальков способность быстро и эффективно прятаться в мягком субстрате, снижая стрессовую нагрузку и маскируя их от потенциального хищника и потенциальной жертвы, дополнительно мотивирует их к более активному образу жизни и стимулирует инстинкты, типичные для засадного хищника.

5. 4. Определение термопреферендума молоди калкана

После помещения в емкость с градиентом температуры воды в диапозоне 19 – 24 °С мальки камбалы 1 - 2 ч перемещались вдоль оси градиента, и затем выбирали, независимо от предварительных температурных адаптаций, диапазон минимальных (для данного эксперимента) значений температуры + 19 + 21 °С. При неоднократном принудительном перемещении мальков в зону с высокими значениями температуры (22 – 24 °С) они неизменно возвращались в зону с более прохладной водой (рис. 5. 3).

Результаты экспериментов показали, что подготовка мальков к выпуску в море должна включать в себя выработку поведенческих реакций молоди на естественные субстраты и объекты питания. Из широкого спектра предлагаемых молоди инертных кормов, высокая степень предпочтения была отмечена по отношению к фаршу кальмара и ставриды. Мясо кальмара содержит легко усваиваемый белок, необходимый для роста молоди. Однако, очевидно, что при массовом выращивании камбалы, кальмар не может быть рекомендован в качестве одного из основных ви-

дов корма по причине его высокой стоимости, но может использоваться как кормовая добавка в наиболее ответственный период онтогенеза – период метаморфоза.

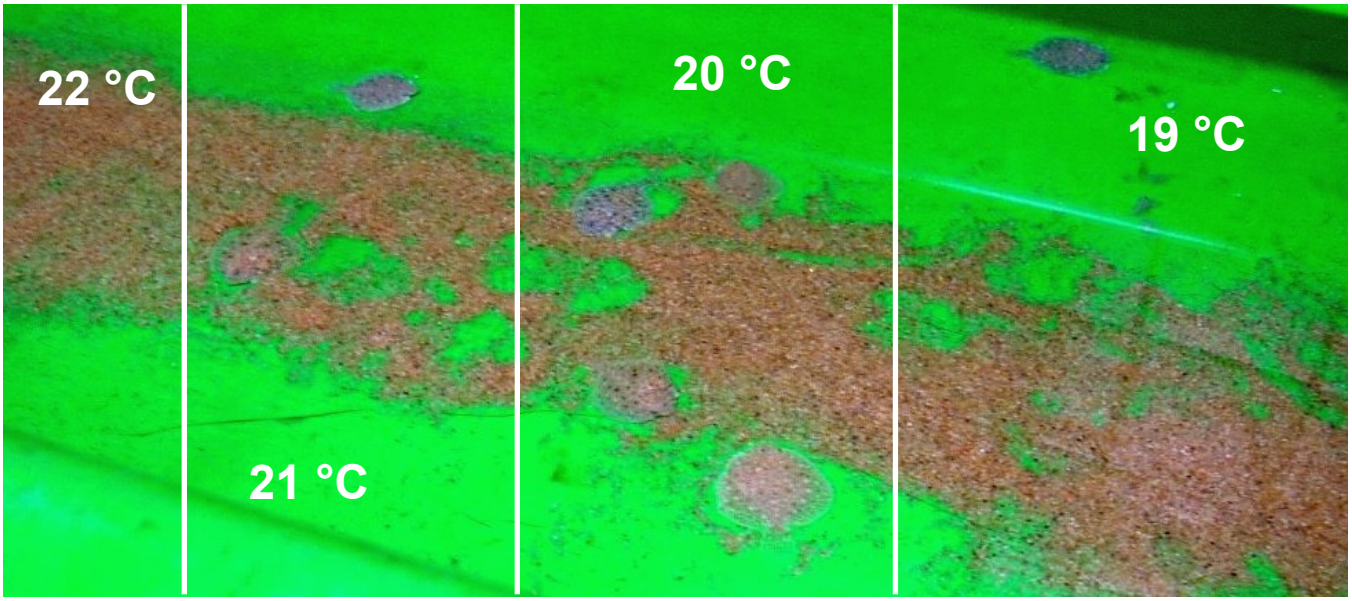


Рис. 5. 3. Концентрирование мальков калкана в экспериментальном баке в зоне температурного диапазона 19 – 22 °C

При искусственном выращивании калкана метанауплии артемий рекомендуется применять в качестве корма только в первой половине периода метаморфоза. Тем не менее, их, как хорошо усваиваемый корм, можно добавлять в рацион мальков перед выпуском, насыщая предварительно витаминами и пробиотиками, необходимыми для повышения иммунитета и роста мальков, что более затруднительно при применении инертных кормов.

Среди естественных кормовых объектов, к которым нужно адаптировать молодь калкана перед выпуском, нереис является одним из доминантных видов зон её обитания [38]. Кроме того, этот кормовой объект является источником активно участвующих в обмене веществ: провитамина D и холестерина, а также некоторых микроэлементов, в частности Fe, Al, Ti, Li, Ni [1], необходимых для правильного роста и развития молоди. Введение нереиса в рацион мальков целесообразно также для предварительной адаптации к естественным кормовым объектам, перед выпуском в

море, так как мальки привыкают к типичным движениям жертвы, учатся ее распознавать и вырабатывают определенную тактику охоты.

Науплиусами копепод личинки калкана питаются уже на начальных стадиях своего развития, переходя на питание копеподитами в начале метаморфоза. Присутствие копепод в рационе молоди положительно влияет на формирование правильной пигментации и скелета [8]. Несмотря на то, что по мере роста молодь калкана переходит на более крупные кормовые объекты, в желудках сеголетков, отловленных в естественной среде обитания, длиной 6 – 7 см, все еще обнаруживают копепод [38]. Поэтому, при адаптации молоди к выпуску в море, важно вводить в ее рацион этот вид живого корма.

Введение ограниченного количества гаммарид в рацион подготавливаемой к выпуску в море молоди калкана также необходимо, несмотря на низкие значения калорийности и усвояемости. В мелководной прибрежной зоне, куда часто подходит молодь калкана для питания, в разлагающихся остатках макрофитов преобладают гаммариды, и для их успешной поимки малькам необходим определенный навык.

Таким образом, исходя из полученных нами данных, искусственно выращенную полностью метаморфизированную молодь калкана (в возрасте 3 –3,5 мес.) для достижения высокой выживаемости в море, перед выпуском необходимо адаптировать к естественным условиям среды в зависимости от характеристик биотопа. Для этого нужно проводить предварительное изучение абиотических (температура, грунт, течения) и биотических (кормовая база, наличие хищников) характеристик района выпуска молоди калкана. Желательно, чтобы температура воды в зоне выпуска не превышала 21 °С, предпочтительно наличие мягких песчаных или илисто-песчаных грунтов, к структуре и цвету которых мальки должны быть предварительно адаптированы для приобретения ими покровительственной окраски и умения полностью укрываться в грунт. Прибрежные течения не должны быть настолько сильными, чтобы выносить мальков за пределы оптимального биотопа.

Перед подготовкой мальков к выпуску желательно проводить исследование потенциальной кормовой базы, а именно наличия в зоне выпуска организмов из спектра питания калкана, например, мальков пелагических рыб, нереиса и гаммарид.

Адаптация мальков калкана к абиотическим и биотическим характеристикам среды обитания, особенно к грунту и потенциальным кормовым объектам, доминирующим в намеченном районе выпуска, должна проводиться не менее 2-3 недель до выпуска. В момент выпуска они должны обладать хорошо сформированным пищевым поведением и защитными реакциями: уметь мимикрировать под конкретный грунт и эффективно охотиться на живые объекты, характерные для данного биотопа. Именно камуфляжное поведение (степень мимикрии) молоди калкана, как типичного засадного хищника будет определять степень ее защиты от выедания и успешный переход на питание живыми кормовыми объектами в естественных условиях. Для оценки эффективности зарыбления акваторий выращенной молодью необходимо метить ее методом прижизненной окраски отолитов перед выпуском и проводить мониторинг выживаемости, скорости роста, упитанности, групп сеголетков калкана в течение последующих 2-х месяцев, и годовиков в последующий весенне-летний период в зонах выпуска.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами данные по влиянию вида микроводорослей на скорость питания и продукцию коловраток, на изменение бактериальной численности в средах инкубации икры, выращивания личинок и их кормовых организмов, на колонизацию бактериями поверхности науплиев артемий и икры калкана в искусственных системах с немногочисленными компонентами подтверждают сложность и неоднозначность процессов множественного взаимодействия между живыми компонентами в природных экосистемах. Безусловно, полученные в искусственных экспериментальных экосистемах закономерности нельзя считать адекватными естественным закономерностям, однако, некоторые результаты экспериментальных данных, возможно, применимы и к естественным сообществам. При прогнозировании уровня вторичной продукции от уровня первичной продукции необходимо учитывать не только общую биомассу и продукцию микроводорослей, но и продукцию отдельных таксонов микроводорослей, так как продукция планктонных животных (в

нашем примере, коловраток) будет находиться в зависимости от хемотаксономических характеристик доминирующих в водоемах видов фитопланктона. При расчетах потенциальной выживаемости икры рыб в море нужно непременно учитывать уровень эвтрофикации района, в котором развивается икра, и определять доминирующие таксоны микроводорослей, которые могут снижать уровень возможной контаминации среды бактериальными патогенам. Для оценки состояния бактериального сообщества в водоемах может быть также рекомендован метод определения соотношения *r* или *K* стратегов.

При использовании выращенной молоди рыб для зарыбления естественных водоёмов необходимо учитывать разнообразные физические и биологические факторы, характеризующие каждый конкретный биотоп, и возможность адаптации молоди рыб к конкретным условиям.

Данные, полученные в работе позволят оптимизировать существующие методики культивирования камбалообразных и их кормовых организмов: например, применение предварительной трофической адаптации и использование в качестве основного корма микроводоросли *Phaeodactylum tricornutum* при культивировании коловраток позволит повысить их продукцию в короткий срок.

Антибактериальное действие *Chlorella vulgaris*, выявленное на различных этапах культивирования калкана, позволяет рассматривать данный вид микроводорослей как перспективный и непременный компонент биотехнологического комплекса выращивания личинок камбалообразных. Использование хлореллы позволит постепенно отойти от некоторых неселективных методов снижения численности бактерий (озонирование, антибиотики), сопряженных с рядом отрицательных моментов (токсичность, травматизация икры, развитие оппортунистической микрофлоры, загрязнение окружающей среды).

Предложенные принципы адаптации молоди калкана к естественным условиям обитания могут значительно снизить процент её смертности при зарыблении, что позволит повысить запасы *S. maeoticus* без дополнительных затрат на подращивание искусственно полученной молоди до товарной массы.

ВЫВОДЫ

В диссертационной работе впервые представлен анализ результатов исследования взаимодействия живых компонентов (микроводоросли, коловратки, артемии, икра, личинки, бактерии) в системе искусственного воспроизводства черноморского калкана *Scophthalmus maeoticus*. Определены основные продукционные показатели *B. plicatilis* при питании микроводорослями разных таксономических групп, подобраны виды микроводорослей, повышающие продукцию коловраток в короткие сроки. Исследована степень токсичности различных доз хлорамфеникола и его влияние на численность бактерий в средах выращивания личинок калкана и его кормовых организмов. Выявлен бактериостатический эффект микроводоросли *Ch. vulgaris* и её фильтрата, позволивший разработать новую методику применения хлореллы в качестве антибактериального средства на проблемных в микробиологическом отношении этапах культивирования личинок калкана и их кормовых организмов. Впервые определены поведенческие особенности, и адаптационные характеристики искусственно выращенной молоди калкана, и разработаны основные принципы её подготовки к естественным условиям обитания перед выпуском в море.

1. Продукционные показатели коловраток зависят от вида микроводорослей, которыми они питаются, и предварительной трофической адаптации. Максимальная удельная скорость роста численности (0,96 сут$^{-1}$) и эффективности роста (27,6%) *Brachionus plicatilis* получены при питании клетками микроводоросли *Phaeodactilum tricornutum*, а минимальные значения (0,16 сут$^{-1}$ и 11,3%) – при питании *Isochrysis galbana.*

2. Хлорамфеникол (при концентрациях 5 - 500 мг·л$^{-1}$) оказывает токсический эффект на клетки микроводоросли *Isochrysis galbana* и снижает численность бактерий в среде их выращивания только на 50%. Кормление коловраток *B. plicatilis* культурой *I. galbana,* предварительно обработанной хлорамфениколом (5 мг ·л$^{-1}$), не оказывает негативного влияния на их воспроизводство.

3. Из всех исследованных видов микроводорослей наиболее выраженным антибактериальным эффектом в среде инкубации икры, выращивания личинок и их кормо-

вых организмов, обладает культура *Chlorella vulgaris* и её фильтрат. Применение *Ch. vulgaris* с целью снижения численности бактерий в системе выращивания калкана целесообразно на всех ранних этапах культивирования данного вида.

4. В присутствии *Chlorella vulgaris* в среде инкубации икры и выращивания науплиев артемии снижается интенсивность бактериальной колонизации покровов данных организмов.

5. Обработка среды инкубации икры озоном приводит к неселективному снижению численности бактерий в ней, однако провоцирует быстрый рост численности оппортунистической микрофлоры, чего не происходит в среде инкубации икры с добавлением клеток хлореллы.

6. Разработаны принципы адаптации молоди к естественным условиям перед выпуском и установлено, что:

а) инертные и живые корма, используемые в аквакультуре (артемия, фарш рыб и кальмара), и живые корма из естественного биотопа (нереис, гаммарус, копеподы) усваивались молодью калкана более чем на 50%. С целью повышения жизнестойкости мальков и формирования у них пище-поисковых навыков данные виды корма целесообразно вводить в рацион молоди, подготавливаемой к выпуску;

б) наиболее высокие значения избирательности трехмесячными мальками калкана получены для гаммарид размеров (4 – 6 мм);

в) длительность адаптации к грунту из предполагаемого места выпуска - не менее двух недель;

г) оптимальная температура воды при выпуске молоди калкана в море составляет 21°С.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Алемов, С. В. *Nereis (Hediste) diversicolor*: физиология, биология и экология в условиях антропогенного загрязнения / С. В. Алемов ; НАН Украины, Ин-т биологии юж. морей им. А. О. Ковалевского. - Севастополь : [Б.и.], 2000. – 96 с.
2. Алфимов, Н. Н. О роли диатомовых и перидиниевых водорослей в самоочищении морских вод / Н. Н. Алфимов // Ботан. журн. – 1959. – Т. 44, № 6. – С. 68–72
3. Апостолов, А. Производство микроводорослей как основной корм в марикультуре / А. Апостолов // IV Междунар. симпоз. по марикультуре (25.09.-01.10. 1989, г. Анапа, Б. Утриш) / М-во рыб. хоз-ва СССР, Ихтиол. комис., ВНИИ мор. рыб. хоз-ва и океанографии. – [М.], 1989. – С. 1–13
4. Бакаева, Е. Н. Эффективность роста коловраток в условиях аквакультуры : автореф. дис. на соискание степени канд. биол. наук : спец. 03.00.18 «Гидробиология» / Елена Николаевна Бакаева. – Минск, 1992. – 20 с.
5. Биотехнология и оборудование для выращивания молоди камбалы калкана / Г. А. Толкаченко, В. Е. Смолов, Ю. Е. Битюкова, О. В. Пантелеева // Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон и комплексное использование ресурсов шельфа : сб. науч. тр. / НАН Украины, Мор. гидрофиз. ин-т. - Севастополь, 2000. – Вып. 2. – С. 430–436.
6. Битюкова, Ю. Е. Морфо-экологические особенности раннего онтогенеза черноморской камбалы калкана *Psetta maeotica* (Pallas) в условиях искусственного выращивания : автореф. дис. на соискание степени канд. биол. наук : спец. 03.00.10 «Ихтиология» / Юния Евгеньевна Битюкова. – Севастополь, 1986. – 24 с.
7. Введенский, О. Г. Особенности рыбохозяйственного освоения водохранилищ / О. Г. Введенский // Актуальные проблемы гидробиологии и ихтиологии : сб. тр. Междунар. интернет-конф. (Казань, дек. 2011 г.) / Казанский (Приволжский) федеральный ун-т. – Казань, 2011. – С. 6–11.

8. Влияние пищевой цепи на развитие пигментации и остификацию камбалы калкан в раннем онтогенезе / А. Н. Ханайченко, Ю. Е. Битюкова, Н. К. Ткаченко, О. Н. Данилюк, Т. Г. Белоиваненко // Проблемы биологической океанографии XXI века : [тез. докл.] Междунар. науч. конф., посвящ. 135-летию Ин-та биологии юж. морей (ИнБЮМ) (г. Севастополь, 19-21 сент. 2006 г). – Севастополь 2006. – С. 171.

9. Вольберг, М. М. Взаимодействие популяций микроводорослей и бактерий в модельной системе : автореф. дис. на соискание степени канд. биол. наук : спец. 03.00.07 “Микробиология” ; 03.00.16 “Экология” / Марина Марковна Вольберг. – М., 1988. – 24 с.

10. Воронина, Е. П. К морфологии и систематике представителей семейства Scophthalmidae / Е. П. Воронина // Вопр. ихтиологии. – 2010. – Т. 50, № 6. – С. 725–733.

11. Галковская, Г. А. Эколого-биологические основы массового культивирования коловраток / Г. А. Галковская, И. Ф. Митянина, В. А. Головчиц. – Минск : Наука и техника, 1988. – 143 с.

12. Гигиняк, Ю. Г. Калорийность водных беспозвоночных животных / Ю. Г. Гигиняк // Общие основы изучения водных экосистем / под ред. Г. Г. Винберга ; АН СССР, Зоол. ин-т. – Л., 1979. – Гл. 2. - С. 43–57.

13. Гирагосов, В. Е. Характер и причины изменчивости основных показателей состояния нерестовой популяции черноморской камбалы калкан на юго-западном шельфе Крыма / В. Е. Гирагосов, А. Н Ханайченко, Д. Е. Ельников // Современные проблемы Азово-Черноморского региона : материалы III Междунар. конф. (г. Керчь 9–11 окт. 2007 г). – Керчь, 2007. – С. 3–9.

14. Дзицкий, В. С. Компьютерная программа для оценки цветовых характеристик окрашенных зоопланктонных организмов / В. С. Дзицкий // Pontus Euxinus 2011 : тез. 7ой междунар. науч.–практ. конф. молодых учёных по проблемам водных экосистем, посвящ. 140-летию Ин-та биологии юж. морей НАН Украины (Севастополь, 24–27 мая 2011 г.). – Севастополь, 2011. – С. 98–99.

15. Динамика роста и выживаемости молоди черноморского калкана (*Psetta maeotica maeotica* Pallas) при годичном цикле выращивания в условиях бассейнового хозяйства научно-исследовательской базы ЮгНИРО «Заветное» / Н. В. Новоселова, Л. И. Булли, А. А. Опекунова, А. С. Бобова, В. Н. Туркулова // Современные рыбохозяйственные и экологические проблемы Азово-Черноморского региона : материалы VIII Междунар. конф. (Керчь, 26-27 июня 2013 г.) / Юж. науч.-исслед. ин-т мор. рыб. хоз-ва и океанографии. - Керчь, 2013. – Т. 2. – С. 120–128.

16. Довбыш, О. Э. Зарубежный опыт развития морской аквакультуры и ее приоритетные задачи в Украине / О. Э. Довбыш, Е. П. Губанов, В. Н. Туркулова // Рыб. хоз-во Украины. – 2010. – № 5. – С. 6–15.

17. Заика, В. Е. Сравнительная продуктивность гидробионтов / В. Е. Заика ; АН УССР, Ин-т биологии юж. морей им. А. О. Ковалевского. – К. : Наук. думка, 1983. – 208 с.

18. Ивлев, В. С. Экспериментальная экология питания рыб / В. С. Ивлев ; АН УССР, Ин-т биологии юж. морей им. А. О. Ковалевского. – К. : Наук. думка, 1977. – 266 с.

19. Ивлева, И. В. Температура среды обитания и скорость энергетического обмена у животных / И. В. Ивлева ; АН УССР, Ин-т биологии юж. морей им. А. О. Ковалевского. – К. : Наук. думка, 1981. – 140 с.

20. Киселев, И. А. Планктон морей и континентальных водоемов : [В 2-х т.] / И. А. Киселев ; АН СССР. Зоол. ин-т. - Л., 1969. - Т. 2. : Распределение, сезонная динамика, питание и значение. - 1980. - С. 316–317.

21. Коваль, И. В. Состояние и тенденции развития аквакультуры в приморском крае / И. В. Коваль, И. А. Овчинникова // Вестн. ТГЭУ. – 2013. – №. 1 (65). – С. 36–47.

22. Марти, Ю. Ю. Материалы к биологии черноморской камбалы калкана (*Rhombus maeoticus* Pallas) / Ю. Ю. Марти // Сборник, посвященный научной деятельности почётного члена Академии наук СССР, заслуженного деятеля

науки и техники Николая Михайловича Книповича (1885—1939). - М. ; Л., 1939. – С. 232–254.

23. Маслова, О. Н. Получение посадочного материала камбалы калкана в опытно-промышленных условиях / О. Н. Маслова // Междунар. симп. по марикультуре : тез. докл. (г. Краснодар, 24-27 сент., 1995 г.). – М., 1995. – С. 63–64.

24. Матишов, Г. Г. Аквакультура: состояние, перспективы, биотехнологии для юга России / Г. Г. Матишов, Е. Н. Пономарев // Современные рыбохозяйственные и экологические проблемы Азово-черноморского региона : материалы VII междунар. конф. (Керчь, 20–23 июня 2012 г.) / Юж. науч.-исслед. ин-та мор. рыб. хоз-ва и океанографии. – Керчь, 2012. – Т. 2. – С. 3–10.

25. Методы определения продукции водных животных: методическое руководство и материалы / под общ. ред.: Г. Г. Винберг ; АН СССР, Всесоюзное микробиол. о-во, Белорусский гос. ун-т им. В. И. Ленина. – Минск : Вышэйшая школа, 1968 . – 245 с.

26. Муравьева, И. П. Некоторые факторы, влияющие на самоочищение морской воды / И. П. Муравьева, Т. О. Гапонюк // Экология моря. – 2004. – Вып. 66. – С. 79–81.

27. Мониторинг микрофлоры в системе выращивания личиночных стадий камбалы калкана Psetta maeoitica Pallas / А. Н. Ханайченко, Ю. Е. Битюкова, О.Г. Найданова, Н. К. Ткаченко, О. Д. Пантелеева, Т. Г. Белоиваненко // Экология моря. – 2000. – Вып. 53. – С. 82–87.

28. Новоселова, Н. В. Влияние некоторых экологических факторов среды на рост и выживаемость молоди черноморского калкана (*Psetta maeotica maeotic* Pallas) при выращивании в искусственных условиях / Н. В. Новоселова, В. Н. Туркулова // Современные рыбохозяйственные и экологические проблемы Азово-черноморского региона : материалы VII междунар. конф. (Керчь, 20–23 июня 2012 г.) / Юж. науч.-исслед. ин-та мор. рыб. хоз-ва и океанографии. – Керчь, 2012. – Т. 2. – С. 30–36.

29. Овен, Л. С. Особенности онтогенеза и характеристика нереста морских рыб / Л. С. Овен / АН УССР, Ин-т биологии юж. морей им. А. О. Ковалевского. – К. : Наук. думка, 1976. – 132 с.

30. Основные результаты многолетней деятельности и перспективы исследований ЮгНИРО в области развития морской аквакультуры в Украине / В. Н. Туркулова, А. П. Золотницкий, Л. И. Були, Н. В. Новоселова, А. А. Солодовников // Основные результаты комплексных исследований в Азово-Черноморском бассейне и мировом океане. – Керчь, 2012. – С. 46–80. - (Тр. ЮгНИРО ; Т. 50).

31. Официальный сайт ФАО [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Psetta_maxima/en.

32. Пат. 2017413 Российская Федерация, МПК АО1К 1/00. Способ искусственного получения молоди черноморской камбалы калкана / Битюкова Ю. Е., Ткаченко Н. К., Владимирцев В. Б., Ханайченко А. Н., Пустоварова Н. И.; заявитель и патентообладатель ИнБЮМ им. А. О. Ковалевского АН Украины. – № 5054176/13; заявл. 20.04.92; опубл. 15.08.94, Бюл. № 15.

33. Пат. 95428 С2 UA, МПК А01К 61/00 Спосіб інтенсивного вирощування мальків камбали калкан / Ханайченко А. М., Гірагосов В. Є., Єльников Д. В. , Рауен Т. В.; заявник Інститут біології південних морів ім. О. О. Ковалевського НАН України. – № 201013904; заявл. 22.11.2010; опубл. 25.07. 2011, Бюл. №14.

34. Петренко, О. А. Основные итоги, проблемы деятельности ЮгНИРО в 2010 году / О. А. Петренко, А. А. Солодовников // Тр. Юж. науч.-исслед. ин-т мор. рыб. хоз-ва и океанографии. – 2011. – Т. 49. – С. 4–11.

35. Петренко О. А. Основные результаты деятельности ЮгНИРО в 2013 году / О. А. Петренко, А. А. Солодовников, Б. Г. Троценко // Тр. Юж. науч.-исслед. ин-т мор. рыб. хоз-ва и океанографии. - 2014. – Т. 52. – С. 4–10.

36. Попова, В. П. Исследование биологии камбалы калкана в связи с вопросами ее искусственного воспроизводства / В. П. Попова // Биологические основы морской аквакультуры / АН УССР, Ин-т биологии юж. морей им. А. О. Ковалевского. – К., 1975. – Вып.1. – С. 5-11.

37. Попова, В. П. Некоторые закономерности динамики численности камбалы калкана Черного моря / В. П. Попова // Тр. АзЧерНИРО.– 1966. – Вып. 24. – С. 87–95.

38. Попова, В. П. Питание камбалы-калкан в Черном море / В. П. Попова // Тр. АзЧерНИРО.– 1958. – Вып. 17. – С. 141–151.

39. Рауэн, Т. В. Влияние микроводорослей и их фильтратов на численность бактерий в среде выращивания камбалы калкана / Т. В. Рауэн, А. Н. Ханайченко, В. С. Муханов // Мор. экол. журн. – 2011. – Т.10, № 3. – С. 48–56.

40. Сеничкина, Л. Г. Вычисление объёмов клеток диатомовых водорослей с использованием коэффициентов объёмной полноты / Л. Г. Сеничкина // Гидробиол. журн. – 1986. – Т. 22, № 1. – С. 56–59.

41. Сеничкина, Л. Г. К методике вычисления объема клеток фитопланктона / Л. Г. Сеничкина // Гидробиол. журн. – 1978. – Т. 14, № 5. – С. 102–105.

42. Туркулова, В. Н. Опыт и перспективы развития морского садкового рыбоводства в Украине / В. Н. Туркулова // Проблеми розвитку морської та прісноводної аквакультури : зб. доп., зроблених на наук.-практ. конф. – К., 2008. – С. 2–12.

43. Финенко, З. З. Рост и скорость деления водорослей в лимитированных объемах воды / З. З. Финенко, Л. А. Ланская // Экологическая физиология морских планктонных водорослей (в условиях культур) / под общ. ред. К. М. Хайлова ; АН УССР, Ин-т биологии юж. морей им. А. О. Ковалевского. – К., 1971. – Гл. 2. - С. 22–51.

44. Ханайченко, А. Н. Микробиологические проблемы культивирования морских рыб на ранних стадиях развития (на примере камбалообразных) и пути их решения / А. Н. Ханайченко // Мор. экол. журн.– 2005. – Т. 4, № 2. – С. 23–37.

45. Ханайченко, А. Н. Питание и продуцирование коловраток в экспериментальных популяциях при комбинированном воздействии температуры и трофических условий (на примере Brachionus plicatilis Muller, 1786) : автореф. дис. на соискание науч. степени канд. биол. наук : спец. 03.00.17 «Гидробиология» / А. Н. Ханайченко. – Минск ; Севастополь, 1988. – 24 с.

46. Ханайченко, А. Н. Искусственное разведение камбаловых: история вопроса и перспективы их выращивания на Черном море / А. Н. Ханайченко, Ю. Е. Битюкова // Рыб. хоз-во Украины. – 1999. – № 4 (7). – С. 15-17.

47. Чепурнов, А. Культивирование рыб Черного моря в замкнутых системах / А. В. Чепурнов ; АН УССР, Ин-т биологии юж. морей им. А. О. Ковалевского. – К. : Наук. думка, 1989. – 104 с.

48. Шишло, Л. А. Современное состояние запасов черноморского калкана и перспективы его промысла / Л. А. Шишло // Основные результаты комплексных исследований ЮгНИРО в Азово-Черноморском бассейне и Мировом океане : [материалы отчетной сессии по итогам НИР ЮгНИРО в 1992 г.]. – Керчь, 1993. – С. 84–89. - (Тр. ЮгНИРО ; Т. 39).

49. Шляхов, В. А. Итоги многолетних рыбохозяйственных исследований ЮгНИРО по оценке запасов и параметров популяций рыб придонного комплекса в Черном и Азовском морях / В. А. Шляхов // Тр. Юж. науч.-исслед. ин-т мор. рыб. хоз-ва и океанографии. – 1997. – Т. 43.– С. 48–59.

50. A review of some problems in zooplankton production studies / H. H. Bottrell, A. Duncan, Z. M. Gliwicz, E. Grygierek, A. Herzig, A. Hilbrik-Ilkovska, H. Kurasava, P. Larsson, T. Weglenska // Norw. J. Zool. – 1976. – Vol. 24. – P. 419–456.

51. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe / P. Dhert, G. Rombaut, G. Suantika, P. Sorgeloos // Aquaculture. – 2001. –Vol. 200, iss. 1-2. – P. 129–146.

52. Alcaide, E. Occurrence of drug-resistant bacteria in two European eel farms / E. Alcaide, M. D. Blasco, C. Esteve // Appl. Envir. Microbiol. – 2005. – Vol. 71, iss. 6. – P. 3348–3350.

53. Amaro, H. M. Antimicrobial activities of microalgae: an invited review / H. M. Amaro, A. C. Guedes, F. X. Malcata // In A. Mendez – Vilas (ed.). Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances. – P. 1272–1280.

54. Andrews, J. H. Relevance of r- and K- theory to the ecology of plant pathogens / J. H. Andrews // Current perspectives in microbial ecology : proc. of the Third intern.

symp. on microbial ecology, Michigan State Univ., 7-12 Aug. 1983 / Eds.: M. Klug, C. Reddy. – Washington, D.C., 1984. – P. 1–7.

55. Andrews, J. H. r and K-selection and microbial ecology / J. H. Andrews, R. F. Harris // Adv. Microb. Ecol. – 1986. – Vol. 9. – P. 99–144.

56. Austin, B. Microbiology of laboratory-hatched brine shrimp (Artemia) / B. Austin, D. Allen // Aquaculture. – 1982. – Vol. 26, iss. 3-4. – P. 369–383.

57. Axenic culture of *Brachionus plicatilis* using antibiotics / K. Suga, Y. Tanaka, Y. Sakakura, A. Hagiwara // Hydrobiologia. – 2010. – Vol. 662. – P. 113–119.

58. Bachere, E. Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: potential tools for disease control in larviculture / E. Bachere // Aquaculture. – 2003. – Vol. 227, iss. 1-4. – P. 427–438.

59. Bailly, N. Scophthalmus Rafinesque, 1810: the valid generic name for the turbot, *S. maximus* (Linnaeus, 1758) [Pleuronectiformes: Scophthalmidae] / N. Bailly, B. Chanet // Cybium. – 2010. – Vol. 34, no. 3. – P. 257–261.

60. Berland, B. R. Are some bacteria toxic for marine algae? / B. R. Berland, D. J. Bonin, S. Y. Maestrini // Mar. Biol. – 1972. – Vol. 12, iss. 3. – P. 189–193.

61. Biodiversity of chloramphenicol-resistant mesophilic heterotrophs from Southeast Asian aquaculture environments / G. K. Huys, M. Bartie, D. T. Cnockaert, D. T. Hoang Oanh, N. T. Phuong, T. Somsiri, S. Chinabut, F. M. Yusoff, M. Shariff, M. Giacomini, A. Teale, J. Swing // Res. Microbiol. – 2007. – Vol. 158, iss. 3. – P. 228–235.

62. Boraas, M. E. Population dynamics of food–limited rotifers in two-stage chemostat culture / M. E. Boraas // Limnol. Oceanogr. – 1983. – Vol. 28, no. 3. – P. 546–563.

63. Boyer, M. Cell–cell signaling in bacteria: not simply a matter of quorum FEMS / M. Boyer, F. Wisniewski-Dye // Microb. Ecol. – 2009. – Vol 70, iss. 1. – P. 1–19.

64. Bruce, D. L. The identification of two antibacterial products of the marine planktonic algae *Isochrysis galbana* / D. L. Bruce, D. C. B. Duff // J. Gen. Microbiol. – 1967. – Vol. 48, no. 2. – P. 293–298.

65. Chemical disinfection of Artemia nauplii / B. R Gomezgil, F. A. A. Grobois, J. R. Jarero, M. Herrera-Vega // J. World Aquacult. Soc. – 1994. – Vol. 25, iss. 4. – P. 579–583.

66. Chotiyaputta, C. Food Selectivity of the rotifer *Brachionus plicatilis* feeding on phytoplankton / C. Chotiyaputta, K. Hirayama // Mar. Biol. – 1978. – Vol. 45, iss. 2. – P. 105–111.

67. Collins, T. J. ImageJ for microscopy / T. J. Collins // BioTechniques. – 2007. – Vol. 43, no. S1. – P. S25–S30.

68. Combined effect of temperature and food concentration on the grazing rate of the rotifer *Brachionus plicatilis* / D. Montagnes, S. Kimmance, G. Tsounis, J. C. Gumbs // Mar. Biol. – 2001. – Vol. 139, iss. 5. – P. 975–979.

69. Commercial applications of microalgae / P. Spolaore, C. Joannis-Cassan, E. Duran, A. Isambert // J. Biosci. Bioeng. – 2006. – Vol. 101, iss. 2. – P. 87–96.

70. Comparison of mortality of wild and released reared 0-group turbot, *Scophthalmus maximus,* on an exposed beach (Ría de Vigo, NW Spain) and a study of the population dynamics and ecology of the natural population / J. Iglesias, G. Ojea, J. J. Otero, L. Fuentes, T. Ellis // Fisheries Manag. Ecol. – 2004. – Vol. 10, iss. 1. – P. 51–59.

71. Control of the bacterial flora of *Brachionus plicatilis* and *Artemia franciscana* by incubation in bacterial suspensions / P. Makridis, J. A. Fjellheim, J. Skjermo, O. Vadstein // Aquaculture. – 2000. – Vol. 185, iss. 3-4. – P. 207–218.

72. Coutteau, P. Micro-algae / P. Coutteau // Manual on the production and use of live food for aquaculture / Eds.: P. Lavens, P. Sorgeloos. – Rome, 1996. – P. 7–48. - (FAO Fisheries Technical Paper ; no. 361).

73. Coves, D. Rotifer-rearing technology / D. Coves, P. Audineau, J. L. Nicolas // Aquaculture / Ed.: G. Barnabe. – West Sussex (England), 1990. – P. 232–245.

74. Disruption of bacterial cell-to-cell communication by marine organisms and its relevance to aquaculture / F. M. I. Natrah, T. Defoirdt, P. Sorgeloos, P. Bossier // Mar. Biotechnol. – 2011. – Vol. 13, iss. 2. – P. 109–126.

75. Disruption of bacterial quorumsensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture / T. Defoirdt, N. Boon, P. Bossier, W. Verstaete // Aquaculture. – 2004. – Vol. 240, iss. 1- 4. – P. 69–88.

76. Dhert, P. Rotifers / P. Dhert // Manual on the production and use of live food for aquaculture / Eds.: P. Lavens, P. Sorgeloos. – Rome, 1996. – P. 298. - (FAO Fisheries Technical Paper ; no. 361).

77. Doohan, M. An Energy Budget for adult *Brachionus plicatilis* Muller (Rotatoria) / M. Doohan // Oecologia. – 1973. – Vol. 13, no. 4. – P. 351–362.

78. Duff, D. C. B. The antibacterial activity of marine planktonic algae / D. C. B Duff, D. L. Bruce, N. J. Antia // Can. J. Microbiol. – 1966. – Vol. 12, no. 5. – P. 877–884.

79. Effects of antibiotics on the growth of *Isochrysis zhangjiangensis* and axenic culture / Z. Huang, X. Liu, Z. Hu, S. Duan // Ecologic Sci. – 2007. – Vol. 2. – P. 120–125.

80. Effects of chloramphenicol, erythromycin, and furazolidone on growth of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros gracilis* / A. I. Campa-Cordova, A. Luna-Gonzalez, F. Ascencio, E. Cortes-Jacinto, C. J. Caceres-Martinez // Aquaculture. – 2006. – Vol. 260, iss. 1-4. – P. 145–150.

81. Effects of chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol on growth of algae *Chlorella pyrenoidosa*, *Isochrysis galbana*, and *Tetraselmis chui* / H-T. Lai, J-H. Hou, C-I. Su, C-L. Chen // Ecotoxicol. Environ. Saf. – 2009. – Vol. 72, iss. 2. – P. 329–334.

82. Effects of five kinds of antibiotics stressed on chlorophyll fluorescence parameters of *Isochrysis sp*. CCMM5001 / M. Zheng, L. Zheng, L. Wang, X-T. Han, H. Li, Z. Cui // Mar. Environ. Sci. – 2011. – Vol. 4. – P. 569–572.

83. Effects of micro-algae commonly used in aquaculture on acyl-homoserine lactone quorum sensing / F. M. I Natrah, M. M. Kenmegne, W. Wiyoto, P. Sorgeloos, P. Bossier, T. Defoirdt // Aquaculture. – 2011. – Vol. 317, iss. 1-4. – P. 53–57.

84. Emmerson, W. D. Predation and energetics of *Penaeus indicus* (Decapoda, Penaeidae) larvae feeding on Brachionus plicatilis and Artemia nauplii / W. D. Emmerson // Aquaculture. – 1984. – Vol. 38, iss. 3. – P. 201-209.

85. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I / D. Marie, F. Partensky, S. Jacquet, D. Vaulot // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – Vol. 63, no. 1. – P. 186-193.

86. Evolution and Function of Innate Immune Receptors – Insights from Marine Invertebrates / P. Rosenstiel, E. E. Philipp, S. Schreiber, T. C. Bosch // J. Innate Immun. – 2009. – Vol. 4, no. 1. – P. 291–300.

87. Evseenko, S. A. Ontogeny and relationships of the flatfishes of the Southern Ocean (Achiropsettidae, Pleuronectoidei) / S. A. Evseenko // J. Ichthyol. – 1996. – Vol. 36, no. 9. – P. 687–712.

88. Fogg, G. E. Algal Cultures and Phytoplankton Ecology / G. E. Fogg. – Madison, WI : Univ. Wisconsin Press, 1965. – 140 p.

89. Frost, B. W. Effects of size and concentration of food particles on the feeding behavior of the Marine planktonic copepod *Calanus Pacificus* / B. W. Frost // Limnol. Oceanogr. – 1972. – Vol. 17, no. 6. – P. 805–815.

90. Gatesoupe, F. J. The continuous feeding of turbot larvae, *Scophthalmus maximus,* and control of the bacterial environment of rotifers / F. J. Gatesoupe // Aquaculture. – 1990. – Vol. 89, iss. 2. – P. 139–148.

91. Hall-Stoodley, L. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases / L. Hall-Stoodley, J. W. Costerton, P. Stoodley // Nat. Rev. Microbiol. – 2004. – Vol. 2, no. 2. – P. 95–108.

92. Hansen, G. H. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish / G. H. Hansen, J. A. Olafsen // Microb. Ecol. – 1999. – Vol. 38, iss. 1. – P. 1–26.

93. Hatchability of eggs from Atlantic cod, turbot and Atlantic halibut after disinfection with ozonated seawater / S. Grotmola, E. Dahl-Paulsenb, G. K. Totlanda // Aquaculture. – 2003. – Vol. 221, iss. 1-4. – P. 245–254.

94. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture / O. E. Heuer, H. Kruse, K. Grave, P. Collignon, I. Karunasagar, F. Angulo // Clin. Infect. Dis. – 2009. – Vol. 49, no. 8. – P. 1248–1253.

95. Hipayama, K. Fundamental study on physiology of rotifer for its mass culture – I. Filter feeding of rotifer / K. Hipayama, S. Ogava // Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. –1979. – Vol. 38. – P. 1207–1214.

96. Howell, B. R. Experiments on the rearing of larval turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) / B. R. Howell // Aquaculture. – 1979. – Vol. 18, iss. 3. – P. 215–225.

97. Ingestion of *Brachionus plicatilis* under different microalgae conditions / W. Zhou, X. Tang, X. Qiao, Y. Wang, R. Wang, L. Feng // Chinese J. Oceanol. Limnol. – 2009. – Vol. 27, iss. 3. –P. 473–479.

98. Inhibitory activity of antibiotic-producingmarine bacteria against fish pathogens / C. P. Dopazo, M. L. Lemos, C. Lodeiros, J. Bolinches, J. L. Barja, A. E. Toranzo // J. Appl. Bacteriol. – 1988. – Vol. 65, iss. 2. – P. 97–101.

99. Ito, N. Studies on the 'Mizukawari' in eel- culture ponds. IV. The vertical distributions of Brachionus plicatilis in 'Mizukawari' ponds / N. Ito, T. Iwai // Rep. Fac. Fish. Prefect. Univ. Mie. – 1956. – Vol. 2. – P. 335–346.

100. John, S. Probiotic activity and antibiotic resistance of microbes isolated from shrimp pond / S. John, J. Patterson // J. Mar. Biol. Ass. India. – 2007. – Vol. 49, no. 2. – P. 127–133.

101. Josupeit, H. European markets for seabass, seabream and turbot / H. Josupeit // Aquacult. Europe. – 1995. – Vol. 20, no. 2. – P. 6–12.

102. Kellam, S. J. Antibacterial activity from marine microalgae in laboratory culture / S. J. Kellam, J. M. Walker // Br. Phycol. J. – 1989. – Vol. 24, iss. 2. – P. 191–194.

103. Kinkelin, P. D. The use of drugs in aquaculture / P. D. Kinkelin, C. Michel // Infofish Intern. – 1992. – Vol. 4. – P. 45–49.

104. Korstad, J. Feeding kinetics of *Brachionus plicatilis* fed *Isochrysis galbana* / J. Korstad, O. Vadstein, Y. Olsen // Hydrobiologia. – 1989. – Vol. 186/187. – P. 51–57.

105. Kureha, H. The experimental studies on the population growth of marine rotifer, *Brachionus plicatilis* O. F. Mueller: III. Investigation of culture systems / H. Kureha // Aquacult. Sci. – 1979. – Vol. 26, no. 4. – P. 178–182.

106. Lavens, P. Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture / P. Lavens, P. Sorgeloos // Manual on the production and use of live food for aquaculture

/ Eds.: P. Lavens, P. Sorgeloos. – Rome, 1996. – P. 245. - (FAO Fisheries Technical Paper ; no. 361).

107. Lucas, J. C. Aquaculture: Farming Aquatic Animals and Plants / J. C. Lucas, P. C. Southgate ; 2nd ed. – N. Y. : Wiley-Blackwell, 2012. – 648 p.
108. Lupin, H. M. Human health aspects of drug and chemical use in aquaculture / H. M. Lupin // The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture / Eds.: C. Rogers, B. Basurco ; CIHEAM. – Zaragoza, 2009. – P. 95–103. - (Options Méditerranéennes. Series A : Mediterranean seminars ; Vol. 86).
109. MacArthur, R. H. The theory of island biogeography / R. H. MacArthur, E. O. Wilson. – Princeton, NJ : Princeton Univ. Press, 1967. – 203 p.
110. Marshall J. A. Superoxide production by marine microalgae / J. A. Marshall, M. Salas, T. Oda // Mar. Biol. – 2005. – Vol. 147, iss. 2. – P. 533–540.
111. Mauchline, J. The Biology of calanoid copepods / J. Mauchline // Advances in Marine Biology / Eds.: J. H. S. Blaxter, A. J. Southward, P. A. Tyler. – San-Diego, CA : Acad. Press, 1998. – Vol. 33. – 710 p.
112. Mayali, X. Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms / X. Mayali, F. Azam // J. Eukaryot. Microbiol. – 2004. – Vol. 51, iss. 2. – P. 139-144.
113. McManus, G. B. Control of marine bacterioplankton populations: Measurement and significance of grazing / G. B. McManus, J. A. Fuhrman // Hydrobiologia. – 1988. – Vol. 159, iss. 1. – P. 51-62.
114. Muller-Feuga, A. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends / A. Muller-Feuga // J,Appl. Phycol. – 2000. – Vol.12, iss. 3-5. – P. 527–534.
115. Naas, K. E. Enhanced first feeding of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) in green water / K. E. Naas, T. Naes, T. Harboe // Aquaculture. – 1992. – Vol. 105, iss. 2. – P. 143 –156.
116. Nicolas, J. L. Bacteries associees aux productions de *Brachionus plicatilis* / J. L. Nicolas, N. N. Joubert // Actes Coloq. IFREMER. – 1986. – Vol. 3. – P. 451–457.
117. Nicolas J. L. Bacterial Flora Associated with a Trophic Chain Consisting of Microalgae, Rotifers and Turbot Larvae: Influence of Bacteria on Larval Survival / J.

L. Nicolas, E. Robic, D. Ansquer // Aquacurture. – 1989. – Vol. 83, iss. 3-4. – P. 237-248.

118. Odum, E. P. Fundamentals of ecology / E. P. Odum. – Philadelphia : W. B. Saunders Company, 1974. – 574 p.
119. Oiestad, V. The Development of a New Farmed Species – Production Technology and Markets for Turbot / V. Oiestad, T. Bjorndal ; Institute for Research in Economics and Business Administration. – Bergen, 2010. – 38 p. - (Working Paper ; no. 51/10).
120. Paulsen H. Growth rate and nutritional status of wild and released reared juvenile turbot in southern Kategat, Denmark / H. Paulsen, J.G. Stottrup // J. Fish Biol. – 2004. – Vol. 65, suppl. 1. – P. 210–230.
121. Person-Le Ruyet, J. Sole and turbot culture / J. Person-Le Ruyet // Aquaculture / Ed. G. Barnabe. – West Sussex, England : Ellis Harwood, 1990. – Vol. 2. – P. 687–734.
122. Peters, R. H. Empirical analysis of zooplankton filtering and feeding rates'/ R. H. Peters, J. A. Downing // Limnol. Oceanogr. – 1984. – Vol. 29, iss. 4. – P. 763–784.
123. Pianka, E. R. R-selection and K-selection / E. R. Pianka // Am. Nat. – 1970. – Vol. 104, no. 940. – P. 592–597
124. Planas, M. Effects of diet on population development of the rotifer *Brachionus plicatilis* in culture / M. Planas, A. Estevez // Helgoland Mar. Res. – 1989. –Vol. 43, iss. 2. – P. 171–181.
125. Pourriot, R. Food and feeding habits of Rotifera / R. Pourriot // Arch. Hydrobiol. Beih. – 1977. – Vol. 8. – P. 243–260.
126. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes / A. Kesarcodi-Watson, H. Kaspar, M. Lategan, L. Gibson // Aquaculture. – 2008. – Vol. 274, iss. 1. – P. 1–14.
127. Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5- kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas* / J. M. Relf, J. R. S. Chisholm, G. D. Kemp, V. J. Smith // Eur. J. Biochem. – 1999. – Vol. 264, iss. 2. – P. 350–357.

128. Rearing of viable juveniles of the Black Sea turbot in experimental conditions / Y. E. Bityukova, N. K. Tkachenko, A. N. Khanaichenko, V. B. Vladimirtsev // Hydrores. – 1990. – Vol. 7, no. 8. – P. 68–71.

129. Rearing of viable juveniles of the Black Sea turbot / Y. E. Bityukova, N. K. Tkachenko, A. N. Khanaichenko, V. B. Vladimirtsev // Hydrores. – 1990. – Vol. 7, no. 8. – P. 78–81.

130. Reitan, K. I. Ingestion and assimilation of microalgae in yolk-sac larvae of halibut *Hippoglossus hippoglossus* (L.) / K. I. Reitan, S. Bolla, Y. Olsen // Larvi '91 : Short communications and abstracts of contributions presented at the international Symposium on Fish and Crustacean Larviculture (Gent, Belgium, August 27-30, 1991). - Gent, 1991. - P. 332–334. - (EAS Special Publication, no. 15).

131. Review of some aspects of marine fish larviculture / P. Sorgeloos, M. Dehasque, P. Dhert, Lavens P. // ICES Mar. Sci. Symp. – 1995. – Vol. 201. – P. 138-142

132. Robin, J. Algae for aquaculture and animal feeds / J. Robin // Technikfolgenabschätzung – Theorie und Praxis. – 2012. – Vol. 21, hf. 1. – P. 23.

133. Rodgers, C. J. Antimicrobial agents in aquaculture: Practice, needs and issues / C. J. Rodgers, M. D. Furones // The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture / Eds.: C. Rogers, B. Basurco ; CIHEAM. – Zaragoza, 2009. – P. 41-59. - (Options Méditerranéennes. Series A : Mediterranean seminars ; Vol. 86).

134. Role of bacteria as food for zooplankton a eutrophic tropical pond (ivory coast) / M. Bouvy, R. Arfi, D. Guiral, M. Pagano, L. Saint-Jean // Neth. J. Aquat. Ecol. – 1994. – Vol. 28, iss. 2. – P. 167–174.

135. Romero, J. Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives / J. Romero, C. G. Feijoo, P. Navarrete // Health and Environment in Aquaculture / Edrs.: E. D. Carvalho, G. S. David, R. J. Silva. – InTech, 2012. - Ch. 6. – P. 159–198.

136. Salvesen, I. Microbial Ecology in early Life Stages of Marine Fish: Development and Evaluation of Methods for Microbial Management in Intensive Larviculture : Dr. Sc. Thesis / I. Salvesen ; Norwegian Univ. of Sci. and Technol. – [Trondheim], 2000.

137. Salvesen, I. Evaluation of four chemicals for surface-disinfection of marine fish eggs / I. Salvesen, L. Jørgensen, O. Vadstein // Eur. Aquacult. Soc. – 1991. – Sp. Publ., no. 15. – P. 406–408.

138. Salvesen, I. Surface disinfection of eggs from marine fish: evaluation of four chemicals / I. Salvesen, O. Vadstein // Aquac. Int. – 1995. – Vol. 3. – P. 155–171.

139. Schlosser, H. L. The significance of some methodological effects on filtration and ingestion rates of the rotifer *Brachionus plicatilis* / H.L. Schlosser, K. Anger // Helgolander Meeresunters. – 1982. – Vol. 35, iss. 2. – P. 215–225.

140. Skjermo, J. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae / J. Skjermo, O. Vadstein // Aquaculture. – 1999. – Vol. 177, iss. 1-4. – P. 333–343.

141. Sorgeloos, P. Manual for the culture and use of brine shrimp Artemia in aquaculture. – Ghent : State Univ. of Ghent, 1986. – 319 p.

142. Subhash, S. K. Antibiotic exposure to minimize microbial load in live feed Isochrysis galbana used for larval rearing of Indian pearl oyster Pinctada fucata / S. K. Subhash, A. P. Lipton, R. R. Paul // Current science. – 2004. – Vol. 87, № 10. – P. 1339-1340.

143. The influence of a selected bacterial strain *Vibrio anguillarum* TR 27 on the growth rate of rotifers in different culture conditions / A. R. S. Harzeveli, H. Van Duffel, T. Defoort, Ph. Dhert, P. Sorgeloos, J. Swings // Aquacult. Int. – 1997. – Vol. 5. – P. 183–188.

144. Toranzo, A. E. An overview of the main infectious problems in cultured turbot: present status and future necessities / A. E. Toranzo, J. L. Barja, S. Devesa // Turbot Culture: Problems and Prospects / Eds.: P. Lavens, R. A. M. Remmerswaal. – Gent, 1994. – P. 106–126. - (Eur. Aquacult. Soc. ; Sp. Publ. no. 22).

145. Tremaine, S. C. Tests of the critical assumptions of the dilution method for estimating bacterivory by microeucaryotes / S. C. Tremaine, A. Mills // Appl Environ Microbiol. – 1987. – Vol. 53, iss. 12. – P. 2914–2921.

146. Use of microalgae bioencapsulated in Artemia during the weaning of Senegalese sole (Solea senegalensis Kaup) / P. Makridis, C. Moreira, R. Alves Costa, P. Rodrigues, M. T. Dinis // Aquaculture. – 2009. – Vol. 292, iss. 3-4. – P. 153–157.

147. Van Stappen, G. Artemia / G. Van Stappen // Manual on the production and use of live food for aquaculture / Eds.: P. Lavens, P. Sorgeloos. – Rome, 1996. – P. 79–250. - (FAO Fisheries Technical Paper ; no. 361).

148. Villegas, C. T. Food value of *Brachionus plicatilis* fed three selected algal species as live food for milkfish, Chanos chanos Forsskal, fry production / C. T. Villegas, O. Millamena, F. Escritor // Aquacult. Fish. Manage. – 1990. – Vol. 21, iss. 2. – P. 213–219.

149. Viso, A. C. Antibacterial and antifungal properties of some marine diatoms in culture / A. C. Viso, D. Pesando, C. Baby // Bot. Mar. – 1987. – Vol. 30, iss. 1. – P. 41-45.

150. Viso, A. C. Fatty acids from 28 marine microalgae / A. C. Viso, J. C. Marty // Phytochemistry. – 1993. – Vol. 34, iss. 6. – P. 1521–1533.

151. Youn, J. Y. Antibiotics and their optimum concentration for axenic culture of marine microalgae / J. Y. Youn, S. B. Hur // Algae. – 2007. – Vol. 22, no. 3. – P. 229–234.

152. Weaning Turbot on dry rehydratable pelleted foods / J. Person Le Ruyet, B. Menu, M. Cadena Roa [et al.] // Presented at World Mariculture Society meeting (Washington, D.C., 9-13 Jan 1983). – Washington D. C. –1983.