

ОПТИМИЗАЦИЯ БИОТЕХНИКИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЛИЧИНОК ГИГАНТСКОЙ УСТРИЦЫ *CRASSOSTREA GIGAS* TH. В ПИТОМНИКЕ

По результатам экспериментов, поставленных по методу латинского квадрата 4x4, определены оптимальные условия, влияющие на рост личинок *Crassostrea gigas* на разных стадиях развития. Для велигеров: золотистая микроводоросль *Isochrysis galbana* в концентрации 50 - 100 тыс. кл./мл при плотности посадки личинок от 5 до 20 тыс. лич./л; для личинок на стадии великонхи: смесь микроводорослей *Isochrysis galbana* + *Chaetoceros calcitrans* в концентрации 50 - 150 тыс. кл./мл при плотности посадки личинок от 3 до 9 тыс. лич./л и температуре воды 21 и 25° С.

Гигантская устрица *Crassostrea gigas* является основным объектом культивирования в Европе. На Черном море вблизи г. Анапы на станции ВНИРО "Большой Утриш" в 80-е годы 20 столетия проведены первые опыты по ее разведению в искусственных условиях [2, 3]. У спата и взрослых особей были отмечены высокий темп роста, устойчивость ко многим болезням и высокая экологическая пластичность [3, 5]. Разведение *C. gigas* на черноморском бассейне возможно только при выращивании личинок и получении спата в искусственных условиях, что связано со стимуляцией нереста. Однако разрозненные и неполные литературные данные об элементах биотехники культивирования личинок не позволяют до настоящего времени создать полноциклическое и рентабельное хозяйство в условиях Северного Причерноморья [2, 3, 9].

Цель настоящей работы: определение оптимальных условий для выращивания личинок *C. gigas* в питомниках и подращивания спата до размещения на ферме.

Материал и методы. Исследования проведены в 2000 и 2001 гг. на базе НИЦ "Государственный океанариум" (бухта Казачья, район Севастополя). Личинки *C. gigas* были получены в результате групповых скрещиваний (5 ♀♀ и 2 ♂♂). Эксперимент по изучению влияния плотности посадки личинок, концентрации корма и состава микроводорослей на рост личинок поставлен по методу латинского квадрата 4x4 [4, 7]. Опыты проводили в два этапа, с личинками на стадии велигера при температуре 21°С и с личинками на стадии великонхи при температуре 25°С продолжительностью соответственно 3 и 4 сут. На первом этапе эксперимента начальные размеры личинок составили 107,0 ± 5,9 мкм (CV = 2,7 %), на втором этапе - высота раковин личинок составила 158,7 ± 18,5 мкм (CV = 5,9 %). На первом этапе эксперимента были заданы следующие уровни факторов: плотность посадки личинок 5, 10, 15 и 20 тыс.лич./л; на втором этапе - 3, 5, 7, 9 тыс.лич./л; суммарная концентрация корма - 50, 100, 150, 200 тыс. кл./мл.

В качестве корма испытывали 5 видов микроводорослей: на первом этапе эксперимента - *Isochrysis galbana* (средний объем клеток 39,19 мкм³), *Phaeodactylum tricornutum* (183,89 мкм³), *Dunaliella viridis* (313,5 мкм³) и их смеси в соотношении клеток 1:1 или 1:1:1; на втором этапе - *Is. galbana*, *Chaetoceros calcitrans* (52,25 мкм³), *Tetraselmis suecica* (505,32 мкм³), а также их смеси 1:1 или 1:1:1. Все культуры находились в фазе роста. Подсчет клеток водорослей проводили в камере Горяева при помощи микроскопа МБИ-3, подсчет личинок - в камере Богорова на микроскопе МБС-9. Каждый раз отбирали по три пробы штампель-пипеткой, предварительно сконцентрировав личинок в объеме 500 мл. Подачу воздуха и смену воды в аквариуме с личинками проводили ежедневно. Выращивали личинок в сосудах объемом 1 л без аэрации морской воды. Вода подавалась из скважины с глубины 18 м и была профильтрована через фильтр с размером пор 10 мкм. Первичную математическую обработку данных (определение $\bar{X}$, $\pm i$, CV) проводили согласно [1]. Для проверки различий между средними значениями для значимых факторов применялся множественный ранговый критерий Дункана [4].

Результаты и обсуждение. В табл. 1 представлены данные по среднесуточным приростам личинок гигантской устрицы на стадии велигера при варьировании двух ко-

Таблица 1. Зависимости суточного прироста (мкм /сут) личинок устрицы *Crassostrea gigas* на стадии велигера от концентрации корма, его состава и плотности посадки личинок
 Table 1 Dependence of daily average growth (mcm/day) of oyster *Crassostrea gigas* larvae at veliger phase upon the food concentration and its composition and density of larvae planting

Плотность личинок, тыс/л Концент- рация корма, тыс. кл/ мл	5	10	15	20
50	11,1 A 1 1,96	5,7 B 5 12,86	10,0 C 9 8,82	7,4 D 13 5,58
100	7,5 B 2 25,72	9,7 C 6 17,64	8,9 D 10 11,16	10,5 A 14 3,92
150	5,0 C 3 26,46	11,1 D 7 16,74	8,4 A 11 5,88	4,5 B 15 38,58
200	6,3 D 4 22,32	10,1 A 8 7,84	3,3 B 12 51,44	3,4 C 16 35,28

Примечания: А – *Isochrysis galbana* ; В – *Is. galbana* + *D. viridis* + *Ph. tricornutum*; С – *Is. galbana* + *D. viridis*; D – *Is. galbana* + *Ph. tricornutum*; в верхнем левом углу каждой ячейки: среднесуточный прирост личинок, мкм/сут; в правом нижнем – сырая биомасса водорослей мг /л (x 10⁶)

Таблица 2. Зависимости суточного прироста (мкм/сут) личинок устрицы *Crassostrea gigas* на стадии великонхи от концентрации корма, его состава и плотности посадки личинок
 Table 2. Dependence of daily average growth (mcm/day) of oyster *Crassostrea gigas* larvae at the veliconkcha phase on food concentration, its composition and density of larvae planting

Плотность личинок, тыс/л Концент- рация корма, тыс. кл/ мл	3	5	7	9
50	19,6 A 1 13,61	26,1 B 5 2,29	18,3 C 9 13,94	22,4 D 13 10,15
100	21,5 B 2 4,58	14,9 C 6 6,97	18,7 D 10 20,30	15,5 A 14 27,22
150	10,4 C 3 41,82	14,2 D 7 30,45	14,9 A 11 40,83	21,1 B 15 6,87
200	10,7 D 4 40,60	12,1 A 8 54,44	21,5 B 12 9,16	11,4 C 16 55,76

Примечания: А - *Isochrysis galbana* + *Tetraselmis suecica*; В – *Is. galbana* + *Chaetoceros calcitrans*, С – *Ch. calcitrans* + *T. suecica*; D – *Is. galbana* + *Ch. calcitrans* + *T. suecica*; в верхнем левом углу каждой ячейки - среднесуточный прирост личинок, мкм/сут; в правом нижнем – сырая биомасса водорослей, мг /л (x10⁶)

личественных факторов: концентрации корма и плотности посадки личинок и одного качественного - состава корма.

В результате математической обработки данных было показано, что среднесуточный прирост гигантской устрицы на стадии велигера не зависит от заданной в опыте концентрации корма ($F_{\text{эксп.}} = 2,97 < F_{\text{табл.}} = 4,8$) и плотности посадки личинок ($F_{\text{эксп.}} 1,65 < F_{\text{табл.}} = 4,8$). Фактор, значимо влияющий на среднесуточный прирост личинок на стадии велигера, - состав корма ($F_{\text{эксп.}} = 5,44 > F_{\text{табл.}} = 4,8$). Путем сравнения максимального и минимального значений с наименьшим значимым рангом показано, что величина среднесуточного прироста личинок достоверно различается при варьировании состава корма. Максимальный прирост был отмечен при корме, состоящем из золотистой микроводоросли *Is. galbana*, и смешанном корме, состоящем из *Is. galbana* + *Ph. tricornutum*. Отмеченный прирост достоверно выше, чем при корме, состоящем из *Is. galbana* + *Ph. tricornutum* + *D. viridis* и *Is. galbana* + *D. viridis*. Следовательно, *D. viridis* не является подходящим кормом для личинок устрицы на стадии велигера. Наблюдается обратная зависимость прироста личинок от биомассы корма ($r = -0,81$, $p = 0,05$). Максимальный среднесуточный прирост личинок был отмечен при концентрации корма 50 тыс. кл./мл, состоящем из *Is. galbana* (биомасса $1,96 \times 10^6$ мг/л) (опыт № 1). Примерно такой же прирост личинок - 10,5 мкм/сут при плотности посадки 20 тыс. лич./л и концентрации клеток *Is. galbana* 100 тыс. кл./мл (№ 14). Среднее значение биомассы водорослей, рассчитанное на 1 тыс. личинок, соответствует $0,392 \times 10^6$ и $0,196 \times 10^6$ мг/л, т. е. расход биомассы водорослей в № 14 в два раза меньше. Таким образом, были определены оптимальные условия для роста велигеров устрицы *C. gigas*: состав корма - *Is. galbana* в пределах 50 - 100 тыс. кл./мл и плотности посадки от 5 до 20 тыс. лич./л.

В эксперименте с личинками устрицы на стадии великонхи суммарная концентрация корма была задана в диапазоне 50 - 200 тыс. кл./мл, а плотность посадки личинок - 3, 5, 7 и 9 тыс. лич./л (табл. 2). Концентрация микроводорослей и состав корма оказались значимыми факторами для роста личинок на стадии великонхи: $F_{\text{эксп.}} = 34,01 > F_{\text{табл.}} = 4,8$ и $F_{\text{эксп.}} = 43,22 > F_{\text{табл.}} = 4,8$ (для числа степеней свободы 3 и 6 и 5 % уровне значимости). Определив разность между средними значениями и величинами наименьших значимых рангов, мы выявили достоверные различия темпов роста личинок при разных уровнях концентрации корма и составе микроводорослей. Максимальный среднесуточный прирост личинок - 21,6 мкм/сут был отмечен при концентрации корма 50 тыс. кл./мл, при 100 тыс. кл./мл - 17,7 мкм/сут; при 150 тыс. кл./мл - 15,2 мкм/сут и при 200 тыс. кл./мл - 13,9 мкм/сут. Между всеми значениями средних различия статистически достоверны. Коэффициент корреляции прироста и концентрации корма составил $r = -0,62$ ($p = 0,05$); прироста и биомассы корма $r = -0,86$ ($p = 0,05$), т. е. наблюдается обратная зависимость темпов роста и концентрации (биомассы) корма.

Состав корма - значимый фактор для поддержания оптимальных темпов роста личинок. Наибольший среднесуточный прирост 22,6 мкм/сут отмечен при составе корма - *Is. galbana* + *Ch. calcitrans*; затем при составе из трех видов микроводорослей *Is. galbana* + *Ch. calcitrans* + *T. suecica* (16 мкм/сут), далее при *Is. galbana* + *T. suecica* (15,5 мкм/сут) и *Ch. calcitrans* + *T. suecica* (13,8 мкм/сут). Между всеми значениями средних величин прироста различия статистически достоверны.

Фактор плотности посадки личинок оказался незначимым для среднесуточного прироста личинок, т. е. достоверных различий среднесуточного прироста личинок при плотности от 3 до 9 тыс. лич./л не отмечено. При сравнении темпа роста личинок в № 2 и № 15 (21,5 и 21,1 мкм/сут соответственно) в условиях плотности посадки 3 и 9 тыс. лич./л и одинаковом составе корма (*Is. galbana* + *Ch. calcitrans*), среднее значение биомассы, рассчитанное на 1 тыс. личинок в № 2, в два раза выше. Следовательно, оптимальными условиями для роста личинок устрицы *C. gigas* на стадии великонхи являются: концентрация корма в пределах 50 - 150 тыс. кл./мл; корм, состоящий из *Is. galbana* + *Ch. calcitrans* в соотношении клеток 1:1; плотность посадки личинок в пределах 3 - 9 тыс. лич./л.

В зависимости от способа культивирования плотность посадки личинок гигантской устрицы может задаваться от 10 тыс. лич./л (на стадии велигера) до 1 - 2 тыс.

лич./л (на стадии великонхи) или 800 и 1000 тыс. лич./л соответственно в закрытой или проточной системе при достаточном количестве корма [9]. Многие авторы отмечают высокую потребность личинок *C. gigas* в кормах в связи с высоким уровнем метаболизма [8, 10]. Метаморфоз личинок устриц находится в прямой зависимости от специфических диет, т. е. состава корма [10]. Максимальный прирост личинок на стадии велигера был отмечен при корме, состоящем из *Is. galbana*; на стадии великонхи - из смеси микроводорослей *Is. galbana* + *Ch. calcitrans*. Золотистая микроводоросль *Is. galbana* и диатомея *Ch. calcitrans* являются наиболее подходящим кормом по размеру клеток (V составляет 39,19 и 52,25 мкм^3 соответственно). Клетки этих водорослей имеют тонкую оболочку, что делает их доступными для усвоения личинками. По суммарному содержанию белков, липидов, углеводов, используемые в качестве корма, микроводоросли можно расположить в следующем порядке: *Is. galbana* - *Ch. calcitrans* - *T. suecica* [12]. Отмечено высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот 20:5(n-3) у микроводоросли *Ch. calcitrans* и незначительное количество у *Is. galbana* и *T. suecica* [11]. Среднесуточный прирост личинок на стадии велигера и великонхи снижается при увеличении биомассы корма ($r = -0,81$ и $r = -0,86$). Высокую биомассу создают виды водорослей с крупными клетками: *T. suecica* (505,32 мкм^3) и *D. viridis* (313,5 мкм^3), которые плохо усваиваются (или совсем не усваиваются) личинками. *D. viridis*, содержащий значительное количество каротиноидов и витаминов, некоторые авторы рекомендуют использовать в качестве добавки к основному корму личинкам устриц [6].

Выводы: 1. Состав корма и концентрация микроводорослей - факторы, значительно влияющие на темпы роста личинок устрицы *Crassostrea gigas*. 2. Оптимальными условиями для роста личинок устрицы на стадии велигера являются: концентрация золотистой микроводоросли *Is. galbana* от 50 до 100 тыс. кл./мл, плотность посадки личинок в пределах 5 - 20 тыс. лич./л; для личинок на стадии великонхи: смесь микроводорослей: *Is. galbana* + *Ch. calcitrans* в соотношении клеток 1:1, концентрация корма 50 - 150 тыс. кл./мл и плотность посадки личинок от 3 до 9 тыс. лич./л.

Благодарим В. И. Холодова за помощь в планировании эксперимента и А. Н. Орленко за предоставленных для работы производителей гигантской устрицы.

1. Лакин Г.Ф. Биометрия. - М.: Высшая школа, 1973. - 342 с.
2. Моница О. Б. Интродукция тихоокеанской устрицы в Черное море // Рыбное хозяйство. - 1983. - №11. - С. 46 - 47.
3. Орленко А. Н., Золотницкий А. П., Спектрова Л. В. Получение спата японской устрицы в Черном море // Рыбное хозяйство. - 1990. - № 3. - С. 60 - 62.
4. Пиркова А. В., Холодов В. И., Ладыгина Л. В. Оптимизация некоторых элементов биотехники культивирования личинок мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Гидробиол. журн.. - 1998. - 34, № 1. - С. 57 - 61.
5. Раков В. А. Биологические основы культивирования тихоокеанской устрицы *Crassostrea gigas* (Th) в заливе Петра Великого // Автореф. дис. ...канд. биол. наук. - Владивосток, 1984. - 24 с.
6. Спектрова Л. В., Панькова С. Л. Культивирование микроводорослей для искусственного разведения устриц // Межд. симп. по совр. пробл. марикультуры в соц. странах, Больш. Утриш, 25 сент. - 10 окт., 1989: тез. докл. - Москва. - 1989. - С. 200 - 203.
7. Хикс Ч. Основные принципы планирования эксперимента - М. Мир, 1967. - 293 с.
8. His E, Seaman M.N.L. Effect of termory starvation on the survival and on subsequent feeding and growth of oyster (*Crassostrea gigas*) larvae // Mar.Biol. - 1992. - 114. - P. 277 - 279.
9. Robert R., Gerard A. Bivalve hatchery technology: The current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France // Aquatic Living Resources. - 1999. - 12, 2. - P. 121 - 130.
10. Robert R., Trintignae P. Microalgues et nutrition larvaire enecloserie de mollusques // Haliotis. - 1997. - 26. - P. 1 - 13.
11. Volkman J Jefferey S. W., Nichols P. D. et.al. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. - 1989. - 128, 3. - P. 219 - 240.
12. Whyte J.C. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. //Aquaculture. - 1987. - 60, N. 3 - 4. - P. 231 - 241.

OPTIMISATION OF BIOTECHNOLOGY REARING OF THE GIGANTIC OYSTER
(*CRASSOSTREA GIGAS* TH.) LARVAE IN HATCHERY

Summary

The factors influencing on *Crassostrea gigas* larvae growth under different stages of their development are presented on the base of using the latin square method 4x4. Prymnesiophyte, *Isochrysis galbana* under the concentration 50000 - 100000 cel/ml, and the oyster larvae setting density 5000 - 20000 lar./l are the optimal conditions for the veligers. The mixture of microalge, *Is. galbana* + *Chaetoceros calcitrans* under the concentration 50000 - 150000 cel./ml, and oyster larvae setting density 3000 - 9000 lar./l and water temperature 21 - 25 °C are the optimal conditions for the veliconkh larvae stage.