

М. В. ЛЕБЕДОВСКАЯ

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
ЛИЧИНОК ГИГАНТСКОЙ УСТРИЦЫ (*CRASSOSTREA GIGAS*)
В МАРИХОЗЯЙСТВАХ (предварительное сообщение)

По результатам опытов, проведённых по схеме полного факторного эксперимента ПФЭ 2², было выявлено, что бактериальное загрязнение морской воды играет важную роль в процессе выращивания личинок гигантской устрицы в условиях питомника. Максимальный среднесуточный прирост (9,1 мкм) личинок гигантской устрицы на стадии велигера отмечен при наименьшем бактериальном загрязнении ОМЧ (100 КОЕ/мл), независимо от плотности посадки личинок. У личинок на стадии великонхи максимальный среднесуточный прирост (12,45 мкм) был достигнут при низкой плотности посадки (1000 экз./л) и наименьшем бактериальном загрязнении морской воды (ОМЧ = 100 КОЕ/мл).

В 1980 г. в Чёрное море была завезена гигантская (дальневосточная, японская, тихоокеанская) устрица (*Crassostrea gigas* Thunberg, 1793) [8], успешно разводимая во многих странах мира. С тех пор ведутся активные работы по совершенствованию биотехнологии культивирования этого вида в условиях Чёрного моря [5, 6, 7, 10, 11, 12]. Однако микробиологическим аспектам уделяется недостаточное внимание, хотя в мировой практике известно много примеров, когда болезни бактериальной этиологии, особенно личинок устриц, наносили значительный ущерб марихозиям.

В связи с этим целью данной работы было провести контроль роста личинок тихоокеанской устрицы при их выращивании в различной по бактериальному загрязнению среде.

Материал и методы. Исследования проводились в 2007 г. в питомнике Научно-исследовательского центра Вооружённых Сил Украины «Государственный океанариум» (бухта Казачья, г. Севастополь). Личинки гигантской устрицы были получены в питомнике с помощью температурной стимуляции нереста производителей. Через 6 сут был проведён эксперимент по изучению влияния бактериального загрязнения морской воды на рост личинок. Опыты ставили по схеме полного факторного эксперимента ПФЭ 2², что позволяло одновременно варьировать два фактора на двух уровнях [1]. В соответствии с планом ПФЭ 2², оба фактора варьировали независимо друг от друга, что давало возможность количественно оценить влияние каждого фактора на изучаемый параметр, а также количественно оценить эффект межфакторного взаимодействия.

Влияние бактериального загрязнения на рост личинок устриц изучали при двух значениях концентраций личинок (табл. 1).

Таблица 1. Кодирование факторов, включённых в реальный эксперимент
Table 1. Encoding of factors, plugged in the real experiment

Факторы	xi	x ₁	x ₂	xi'
Верхний уровень	xi верх	10000	1000	+1
Нижний уровень	xi ниж	1000	100	-1
Базовый уровень	xio	5500	550	0
Шаг варьирования	Δi	4500	450	+1

Примечания: x₁ – концентрация личинок (плотность посадки) экз./л;
x₂ – общее микробное число в среде выращивания (ОМЧ) кл/мл

© М. В. Лебедевская, 2008

Опыты проводились в течение 7 сут при температуре воды 22° С. Начальные размеры личинок (высота раковины) составляли $111,6 \pm 6,4$ мкм. Наблюдения за ростом и развитием личинок проводили, используя микроскоп МБС-9 с помощью камеры Богорова, подсчёт клеток водорослей осуществлялся с помощью микроскопа Микмед-1 в камере Горяева. В качестве корма для личинок устриц использовалась смесь микроводорослей *Monochrysis lutheri* и *Isochrysis galbana* в соотношении клеток 1:1. Суммарная концентрация корма (100 тыс. кл/мл) была оптимальной для личинок данного вида устриц [6]. Для постановки эксперимента использовались сосуды объёмом 2 л, продувка воздухом осуществлялась постоянно. Ежедневная смена морской воды в экспериментальных сосудах сопровождалась промыванием личинок стерильной морской водой, что способствовало сохранению бактериального загрязнения на первоначально заданном уровне.

Морская вода подавалась с глубины 18 м в накопительный бассейн объёмом 2000 л, для эксперимента воду предварительно профильтровывали через фильтр с диаметром пор 10 мкм. Для получения стерильной морской воды использовали пастеризацию. После заполнения стерильных 2 литровых сосудов подготовленной морской водой и добавления микроводорослей, производили отбор проб (трёхкратный) стерильными пипетками в стерильные пробирки. Затем в течение 30 мин из этих проб производился глубинный посев на агаризованные среды (МПА) для определения общего числа мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (ОМЧ). Посевы инкубировали в течение 48 ч при температуре 27° С, после чего проводили подсчёт выросших колоний.

При анализе численности микрофлоры вычислялись значения среднего арифметического и ошибки среднего [3].

Опыты выполняли в трёхкратной повторности; статистическую обработку проводили в последовательности, принятой для многофакторных экспериментов: определяли среднее арифметическое и дисперсию; воспроизводимость экспериментов проверяли по критерию Кохрена; статистическую значимость коэффициентов регрессии определяли по критерию Стьюдента; адекватность уравнения регрессии экспериментальным данным проверяли по критерию Фишера.

Результаты и обсуждение. В табл. 2 представлена матрица планирования и расчёта коэффициентов уравнения регрессии при продолжительности эксперимента 3 сут, данные по среднесуточным приростам личинок гигантской устрицы на стадии велигера при варьировании двух количественных факторов: плотности посадки личинок и общего микробного числа в среде выращивания.

Таблица 2. Матрица планирования и расчёта коэффициентов уравнения регрессии при продолжительности эксперимента 3 сут (личинки устрицы *C. gigas* на стадии велигера)

Table 2. Matrix of planning and calculation of equalization regression coefficients at duration of 3 days experiment (the veliger stage of oyster *C. gigas* larvae)

№	Экспериментальные сосуды и их места				x ₀	x ₁	x ₂	x ₁ x ₂	уср	S _g	S ² _g	yt	(уср - - yt) ²
1	1	2	3	4	+1	+1	+1	+1	6,4	0,66	0,43	6,57	0,029
		4	3	2									
2	4	5	6	7	+1	-1	+1	-1	6,9	0,56	0,31	6,57	0,109
		4	2	1									
3	7	8	9	10	+1	+1	-1	-1	9,2	0,96	0,93	9,03	0,029
		3	1	4									
4	10	11	12	13	+1	-1	-1	+1	9,0	1,31	1,71	9,03	0,001
		2	1	3									
Σ 3,38												Σ 0,168	

Примечание: уср – средние среднесуточные приросты личинок устриц в экспериментальных сосудах

В результате статистической обработки экспериментальных данных было получено уравнение регрессии: $y = 7,88 - 1,23x_2$

Среднесуточный прирост личинок гигантской устрицы на стадии велигера не зависит от заданной в эксперименте плотности посадки (тэсп. = 0,31 < табл. = 2,31). Межфакторное взаимодействие плотности посадки личинок и бактериального загрязнения слабое (тэсп. = 0,69 < табл. = 2,31). Фактор бактериального загрязнения значительно влияет на среднесуточный прирост выращиваемых личинок гигантской устрицы на стадии велигера (тэсп. = 4,73 > табл. = 2,31). При высоком уровне ОМЧ (1000 КОЕ/мл) среднесуточный прирост личинок минимален и равен 6,65 мкм, при низком уровне ОМЧ (100 КОЕ/мл) среднесуточный прирост максимален и составляет 9,11 мкм. Увеличение бактериального загрязнения уменьшает среднесуточный прирост личинок на стадии велигера на 1,23 мкм, что составляет 16 % от среднего прироста в сутки. Следовательно, наиболее благоприятными условиями для роста личинок *C. gigas* на стадии велигера является минимальное бактериальное загрязнение морской воды, плотность посадки личинок (до 10000 экз./л) на стадии велигера не является лимитирующим для их роста фактором.

В табл. 3 представлены матрица планирования и расчёта коэффициентов уравнения регрессии при продолжительности эксперимента 7 суток, данные по среднесуточным приростам личинок гигантской устрицы на стадии великонхи при варьировании двух количественных факторов: плотности посадки личинок и общего микробного числа в среде выращивания.

Таблица 3. Матрица планирования и расчёта коэффициентов уравнения регрессии для размеров личинок на 7 сутки после начала эксперимента (личинки на стадии великонх)
 Table 3. Matrix of planning and calculation of regression equalization coefficients at experiment duration of 7 days (larvae of oyster *C. gigas* on the stage of veliconch)

№	Экспериментальные сосуды и их места				x ₀	x ₁	x ₂	x ₁ x ₂	уср	Sg	S ² g	ут	(уср - ут) ²
1	2				3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	2				3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1	2	3		+1	+1	+1	+1	6,4	1,01	1,03	6,35	0,003
		4	3	2									
2	4	5	6		+1	-1	+1	-1	7,6	0,7	0,49	7,65	0,003
		4	2	1									
3	7	8	9		+1	+1	-1	-1	11,1	0,62	0,39	11,15	0,003
		3	1	4									
4	10	11	12		+1	-1	-1	+1	12,5	12,5	1,21	12,45	0,003
		2	1	3									
												Σ 3,12	Σ 0,012

Примечание: уср – средние среднесуточные приросты личинок устриц в экспериментальных сосудах

Окончательное уравнение регрессии имело вид: $y = 9,4 - 0,65x_1 - 2,4x_2$
 Среднесуточный прирост личинок гигантской устрицы на стадии великонхи в ходе эксперимента составил 9,4 мкм. Оба исследуемых фактора, как плотность посадки (тэсп. = 2,6 > табл. = 2,31), так и бактериальное загрязнение (тэсп. = 9,6 > табл. = 2,31) являются значимыми и играют отрицательную роль для роста личинок. При наличии максимального бактериального загрязнения воды и наибольшей плотности посадки среднесуточный прирост личинок был минимален и составлял всего 6,35 мкм. Совместное действие обоих факторов по уменьшению среднесуточного прироста личинок составляло 65 %.

Однако средние вклады обоих факторов были не равнозначны. Фактор бактериального загрязнения в 4 раза более интенсивен, чем фактор плотности посадки личинок. При минимальной плотности посадки личинок и наличии бактериального загрязнения (ОМЧ = 1000 КОЕ/мл) среднесуточный прирост личинок уменьшался на 51%.

При максимальной плотности посадки личинок (10000 экз./л) и минимальном ОМЧ морской воды (100 КОЕ/мл) среднесуточный прирост личинок уменьшался на 14%.

Межфакторное взаимодействие плотности посадки личинок и бактериального загрязнения слабое ($t_{\text{эксп.}} = 0,2 < t_{\text{табл.}} = 2,31$).

Оптимальными условиями для роста личинок на стадии великонхи являются: низкая плотность посадки (1000 экз./л) и наименьшее бактериальное загрязнение морской воды (ОМЧ = 100 КОЕ/мл), при этом среднесуточный прирост личинок в ходе эксперимента был максимален и составлял 12,45 мкм.

Известно, что загрязнение морских вод промышленными и бытовыми стоками приводит к уменьшению видового разнообразия сообществ морских макроорганизмов [2, 13]. В загрязнённых водах увеличивается количество условно-патогенных видов микроорганизмов, что при ослаблении иммунной системы гидробионтов может вызвать инфекционные заболевания последних. В то же время возможны и другие негативные воздействия микроорганизмов на гидробионты: так, водорастворимые метаболиты бактерий *Pseudoalteromonas*, *Vibrio*, *Pseudomonas* способны препятствовать оседанию личинок беспозвоночных животных [4, 15]. Существуют достаточно разрозненные литературные данные о микробиологических аспектах биотехники культивирования личинок двусторчатых моллюсков. Известно, что размеры личинок мидии *Mytilus edulis* и устрицы *Ostrea edulis* зависят от уровня бактериального и химического загрязнения питательной среды, в которой выращивались используемые для питания личинок водоросли. Размеры личинок при кормлении водорослями, выращенными на питательной среде со сточной водой с большим бактериальным загрязнением, были значительно меньше, чем размеры личинок для кормления которых использовались водоросли, выращенные на контрольной чистой питательной среде Конвея [14].

Выводы. 1. Бактериальное загрязнение морской воды играет важную роль в процессе выращивания личинок гигантской устрицы в условиях питомника. Увеличение бактериального загрязнения морской воды до 1000 КОЕ/мл уменьшает среднесуточный прирост личинок-велигеров на 16 % от среднего прироста в сутки. Максимальный среднесуточный прирост (9,1 мкм) личинок гигантской устрицы на стадии велигера отмечен при наименьшем ОМЧ (100 КОЕ/мл). 2. Плотность посадки (1000 – 10000 экз./л) не является лимитирующим фактором для роста личинок *C. gigas* на стадии велигера, достоверного различия среднесуточного прироста при разной плотности посадки не обнаружено. 3. При выращивании личинок *C. gigas* на стадии великонхи важны оба фактора: и плотность посадки личинок и ОМЧ морской воды. Оба играют отрицательную роль для роста личинок, причём фактор ОМЧ в 4 раза более интенсивен, чем фактор плотности посадки. При наличии максимального загрязнения воды (ОМЧ = 1000 КОЕ/мл) и наибольшей плотности посадки (10000 экз./л) личинки имели минимальный среднесуточный прирост (6,35 мкм). Максимальный среднесуточный прирост (12,45 мкм) был отмечен у личинок на стадии великонхи при низкой плотности посадки (1000 экз./л) и наименьшем бактериальном загрязнении морской воды (ОМЧ = 100 КОЕ/мл).

Благодарности. Автор благодарит к.б.н. В.И. Холодова за помощь в планировании эксперимента и д.б.н., проф. А.В. Гаевскую за редакторскую правку статьи.

1. Адлер Ю.П., Маркова Е.В., Грановский Ю.В. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий. – М.: Наука, 1976. – 279с.
2. Алемов С.В., Бурдяня Н.В., Гусева Е.В. и др. Санитарно-экологические исследования акватории Севастополя // Экология моря. – 2007. – Вып. 73. – С. 5 -15.
3. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Агропромиздат., 1985. – 351 с.

4. Добрецов С.В. Подавление оседания личинок обрастателей водорастворимыми веществами морских эпibiотических бактерий // Биология моря. – 2005. – 31, № 6. – С. 429 – 434.
5. Золотницкий А.П. Биологические основы культивирования промысловых двустворчатых моллюсков (*Bivalvia*, *Mytiliformes*) в Чёрном море: автореф. дисс. ... докт. биол. наук. – Киев, 2004. – 35 с.
6. Ладыгина Л. В. Микроводоросли как кормовые объекты личинок мидий и устриц: автореф. дисс. канд. биол. наук. – Севастополь, 2007. – 24 с.
7. Лебедовская М. В. Особенности роста спата тихоокеанской устрицы (*Crassostrea gigas*) в контролируемых условиях // Рыбное хозяйство Украины. – 2005. – Спец. вып. по материалам научно-практич. конф.: Морские технологии: проблемы и решения (Керчь, 2005). – С. 100 – 102.
8. Моница О. Б. Интродукция тихоокеанской устрицы в Чёрном море // Рыбное хозяйство. – 1983. – №1. – С. 189 – 190.
9. Олескин А. В., Ботвинко И. В., Цавкелова Е. А. Колониальная организация и межклеточная коммуникация у микроорганизмов // Микробиология. – 2000. – 69, № 3. – С. 309 – 327.
10. Орленко А. Н., Золотницкий А. П. Размножение тихоокеанской устрицы в Чёрном море // Рыбное хозяйство Украины. – 2003. – 3, 4. – С. 23 – 26.
11. Пиркова А. В., Ладыгина Л. В. Определение оптимальных условий роста и выживаемости личинок устрицы *Crassostrea gigas* на разных стадиях развития // Рыбное хозяйство Украины. – 2004. – Спец. выпуск по материалам научно-практич. конф.: Морские технологии: проблемы и решения (Керчь, 2004). – С. 173-177.
12. Пиркова А. В., Попов М.А. Динамика линейного и весового роста устриц *Crassostrea gigas*, культивируемых в бухте Карантинная // Рыбное хозяйство Украины. – 2005. – Спец. выпуск по материалам научно-практической конференции: Морские технологии: проблемы и решения (Керчь, 2004 г.). – С. 115 – 116.
13. Христофорова Н.К. Биоиндикация и мониторинг загрязнения морских вод тяжелыми металлами. – Л.: Наука., 1989. – 192 с.
14. Faveris R., Lubet P. Continuous primary production for the feeding of epigeal bivalves / Mechanisms and control of marine biological production. Artificial closed systems. Littoral ecosystems: Nat. Conf. 'Ecotron' (Paris, France, 1979): CNEXO, Paris, 1979 – P. 155 – 180.
15. Holmstrom C., Kjelleberg S. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce active extracellular compounds // FEMS Microbiol. Ecol. – 1999 – 30. – P. 285 – 293.

Научно-исследовательский центр ВС Украины
«Государственный океанариум», г. Севастополь
Институт биологии южных морей НАН Украины, г. Севастополь

Поступила 12 мая 2008 г.

M. V. LEBEDOVSKAYA

MICROBIOLOGICAL ASPECTS OF CULTIVATION OF PACIFIC OYSTER (*CRASSOSTREA GIGAS*) LARVAE ON MARINE FARMS (Preliminary report)

Summary

Influence of sea water bacterial contamination on growth of the Pacific oyster larvae has been studied. The scheme of full factors experiments was used. It is shown that the increasing of sea water bacterial contamination reduces the average daily growth of Pacific oyster larvae.