



УДК 628.19:579:595.384.1

С. В. Статкевич, вед. инж.

Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского, Севастополь, РФ

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ СРЕДЫ ВЫРАЩИВАНИЯ НА РАЗВИТИЕ И ВЫЖИВАЕМОСТЬ ЛИЧИНОК ГИГАНТСКОЙ ПРЭСНОВОДНОЙ КРЕВЕТКИ *MACROBRACHIUM ROSENBERGII* (DE MAN, 1879)

Изучено бактериальное загрязнение морской воды при разных условиях культивирования личинок гигантской креветки *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). Выявлено влияние степени накопления бактериальной микрофлоры в среде на сроки развития и выживаемость личинок. Определены границы оптимального для культивирования уровня микробного загрязнения среды, превышение которого негативно сказывается на темпах личиночного развития креветки.

Ключевые слова: гигантская пресноводная креветка, *Macrobrachium rosenbergii*, личиночные стадии, бактериальное загрязнение, аквакультура

В настоящее время в результате снижения запасов водных живых ресурсов естественного происхождения в мире наблюдается интенсивный рост аквакультуры и её составной части мариккультуры. Одним из основных объектов искусственного воспроизводства являются ракообразные, аквакультура которых успешно развивается в странах с тропическим и субтропическим климатом, тогда как в умеренных широтах культивирование этих гидробионтов занимает достаточно скромное место [3, 4, 7]. Среди десятиногих раков по объёмам производства преобладают креветки, в частности гигантская пресноводная креветка *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879), которая пользуется большим спросом на мировом рынке [7, 9]. Особенность жизненного цикла этой креветки состоит в том, что наиболее важная фаза в её онтогенезе – личиночная – протекает в воде с солёностью 10 – 20‰, в последующем же она обитает исключительно в пресной воде [3, 7].

Производство креветок включает в себя два основных этапа: получение посадочного материала и товарное выращивание. В районах, отличающихся климатическими характеристиками от нативного ареала гигантской креветки, получение её личинок и молоди возможно лишь в контролируемых условиях питомника, а товарное выращивание рекомендуется проводить в открытых водоёмах при температуре воды выше 20°C.

Выращивание личинок гигантской креветки в искусственных условиях является наиболее сложным этапом биотехнологического процесса, в период которого отмечается их высокая смертность [8, 9, 10, 14]. В мировой практике известны примеры, когда болезни бактериального характера становились причиной 100% гибели личинок в течение нескольких часов, нанося огромный вред креветочным хозяйствам [11, 12, 13].

В связи с этим целью данной работы было выявить влияние бактериального загрязнения воды на развитие и выживаемость личинок гигантской креветки в условиях питомника.

Материал и методы. Исследования проводили в 2012 – 2013 гг. в экспериментальном креветочном комплексе Научно-исследовательского центра «Государственный океанариум» (Севастополь).

Материалом для изучения послужили личинки, полученные в результате нереста самок гигантской креветки, и среда их выращивания. Личинок креветки содержали в трёх инкубаторах, каждый объёмом 300 л, при постоянной температуре (30°C) и аэрации. Температуру воды определяли с помощью ртутного термометра с точностью до 0.1°C. Для аэрации воды использовали компрессор Resun ACO – 006 (88 л·мин⁻¹). В ходе экспериментальных работ воду с необходимой для выращивания личинок солёностью (12 ‰) получали путём разбавления черноморской воды обычной водопро-

водной, которую предварительно отстаивали и обеззараживали с помощью ультрафиолетовой установки UV 12 GPM (производительность $2.5 \text{ м}^3 \cdot \text{ч}^{-1}$). Соленость воды определяли с помощью ареометра с точностью 0.0001. В качестве корма для личинок использовали однодневные науплии артемии ($5 \text{ экз} \cdot \text{мл}^{-1}$), полученные в результате выклева из покоящихся яиц (использовали сухие яйца артемии). Ежедневно осуществляли слив воды с нижнего уровня аппаратов, содержащего отход личинок, остатки пищи и продукты жизнедеятельности креветок.

В инкубаторе № 1 фильтрацию и замену воды не проводили, в инкубаторе № 2 осуществляли только фильтрацию воды, в инкубаторе № 3 – постоянную фильтрацию и ежедневную 50% замену воды. Фильтрацию воды выполняли с помощью внешнего фильтра Eheim Classic 2215 ($620 \text{ л} \cdot \text{ч}^{-1}$), для каждого аппарата использовался отдельный фильтр.

Пробы для микробиологических исследований личинок гигантской креветки и воды, в которой их содержали, отбирали перед началом эксперимента, затем каждые четыре дня в течение всех личиночных стадий. Обработано 236 проб и проведено 476 анализов в трёхкратной повторности.

Пробы воды отбирали специальным проботоборником с закреплённой в нём стерильной бутылкой объёмом 0.5 л. Отобранную пробу объёмом 1 мл помещали в пробирку со стерильной морской водой в таком количестве, чтобы получить разведения 1:10 и 1:100.

Личинок гигантской креветки растирали в стерильной ступке стерильной стеклянной палочкой. Для определения массы полученного материала его помещали в стерильную колбу (заранее определяли её массу) и взвешивали на торзионных весах типа ВТ с точностью до 0.01 г. Затем в колбу наливали стерильную морскую воду в количестве, необходимом для разведения 1:10 и 1:100.

Для определения общего микробного числа (ОМЧ) мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (МАФА) подготовленные пробы тщательно перемешивали, взвесь отстаивали в течение 3 мин. Надосадочную жидкость использовали для приготовления последующих разведений, при этом каждый раз используя новую стерильную пипетку. Степень разведения выбирали так, чтобы число колоний на чашке Петри не превышало 300. Из разведений производили глубинный посев (1 см^3 разведения заливали тёплой агаровой

средой). Метод определения МАФА основан на подсчёте колоний, выросших на питательной среде – мясопептонном агаре (МПА) в течение 48 ч при температуре 28°C [1, 2]. Обработку результатов проводили согласно [5].

Количество микроорганизмов в 1 г (1 см^3) рассчитывали по формуле [1]:

$$a = b * c / d,$$

где: a – количество микроорганизмов в 1 г (1 см^3) исследуемого материала, ($\text{КОЕ} \cdot \text{г}^{-1}$, $\text{КОЕ} \cdot \text{см}^{-3}$); b – среднее число колоний микроорганизмов на чашке Петри; c – разведение; d – навеска материала, взятая для анализа (г , см^3).

Для определения дрожжей и плесневых грибов использовали среду Сабуро. По 1 см^3 исходного разведения, полученного при определении общей бактериальной обсеменённости, высевали в чашки Петри и заливали $15 - 20 \text{ см}^3$ питательной среды Сабуро. Через 5 сут. посеы просматривали. Культивирование осуществляли при температуре 28°C . Результаты микроскопирования оценивали по ГОСТУ 10444.12-88 [6]. Полученные результаты пересчитывали на массу пробы исследуемого образца креветки или объём пробы воды.

В начале эксперимента во всех трёх инкубаторах ОМЧ воды составляло $56 \pm 4 \text{ КОЕ} \cdot \text{мл}^{-1}$, ОМЧ личинок гигантской креветки – $55 \pm 10 \text{ КОЕ} \cdot \text{г}^{-1}$. В каждый инкубатор было посажено по 20000 личинок. Одновременно с отбором проб воды производили подсчёт количества личинок креветки в инкубаторах и определяли стадии их развития. Определение количества личинок осуществляли путём отбора проб объёмом 50 мл в 5 точках (в 4-х углах инкубатора и в центре) мерным стаканом. Перед отбором проб в аппаратах отключали аэрацию и фильтрацию и плавно перемешивали личинок в инкубаторе стеклянной трубкой. Подсчёт личинок производили в каждой пробе, находили среднее значение, а затем рассчитывали количество личинок во всём объёме инкубатора (300л).

При анализе численности микрофлоры вычисляли среднее значение и стандартное отклонение.

Результаты. Результаты исследований показали, что уже на 4 сутки проведения эксперимента в инкубаторе № 1 отмечался резкий рост микробного числа в воде, превысив первоначальное значение в 17.6 раз (табл. 1).

Табл. 1 Результаты микробиологических исследований среды выращивания личинок гигантской креветки (инкубатор № 1)

Table 1 Results of microbiological studies of environment of giant prawn larvae cultivation (tank № 1)

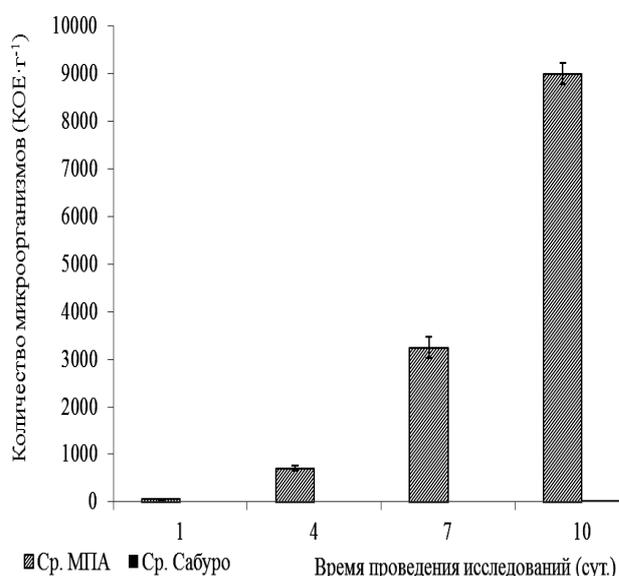
День проведения эксперимента	Количество микроорганизмов в воде		Количество личинок, шт.	Стадия личиночного развития (%)
	На среде МПА (ОМЧ) (КОЕ·мл ⁻¹)	На среде Сабуро (КОЕ·мл ⁻¹)		
1	56 ± 4	Роста нет	20000	I (100)
4	983 ± 21	Роста нет	18300	II (65) – III (35)
7	3971 ± 227	22 ± 7	10900	II (50) – III (45) – IV (5)
10	9702 ± 911	41 ± 4	2400	II (70) – IV (30)
13	Сливной рост	75 ± 19	320	III (50) – IV (50)

Обсеменённость личинок креветки микроорганизмами в этот период составила 708 ± 8 КОЕ·г⁻¹.

На 7 сутки ОМЧ воды продолжало значительно расти, отмечен также рост микроорганизмов на среде Сабуро. Высокое значение микробного числа воды оказало негативное влияние на развитие и выживаемость личинок креветки. Так, на 7 день проведения эксперимента большая часть личинок находилась на II – III стадиях развития, и только 5 % личинок (от общего количества) – на IV. В этот период отход креветок составил 45.5 % (от первоначального количества личинок). ОМЧ креветки увеличилось в 59 раз относительно первоначального значения – 3241 ± 226 КОЕ·г⁻¹ (рис. 1).

На 10 сутки ОМЧ воды увеличилось на два порядка относительно первоначального значения. В это же время ОМЧ личинок составило 9001 ± 225 КОЕ·г⁻¹, отмечен также рост микроорганизмов на среде Сабуро – 21 ± 6 КОЕ·г⁻¹. На данном этапе личинки находились на III (70 %) – IV (30 %) стадиях развития, их численность снизилась до 2400 экз., что в 8.3 раза меньше первоначального количества.

На 13-й день в воде отмечался сливной рост микроорганизмов на среде МПА, на среде Сабуро – незначительный рост. В этот период наблюдался максимальный отход личинок, за 4 дня их количество уменьшилось в 7.5 раза и составило 320 экз., которые находились на III (50 %) – IV (50 %) стадии своего развития. Че-



рез сутки все личинки в исследуемом инкубаторе погибли.

Рис. 1 Численность микроорганизмов, выделенных от личинок гигантской креветки (инкубатор № 1)
Fig. 1 The number of microorganisms isolated from the larvae of the giant prawn (tank № 1)

В инкубаторе № 2, в котором проводили только фильтрацию воды, на 4-е сутки эксперимента личинки находились на II – IV стадиях развития (табл. 2). Их обсеменённость микроорганизмами составила 87 ± 8 КОЕ·г⁻¹.

На 7-е сутки исследования, когда 50 % личинок находились на III стадии и 50 % – на IV, ОМЧ воды возросло в 5.6 раз относительно первоначального значения. ОМЧ личинок креветок увеличилось в 5 раз (относительно первоначального значения) и достигло 280 ± 73 КОЕ·г⁻¹.

Табл. 2 Результаты микробиологических исследований среды выращивания личинок гигантской креветки (инкубатор № 2)

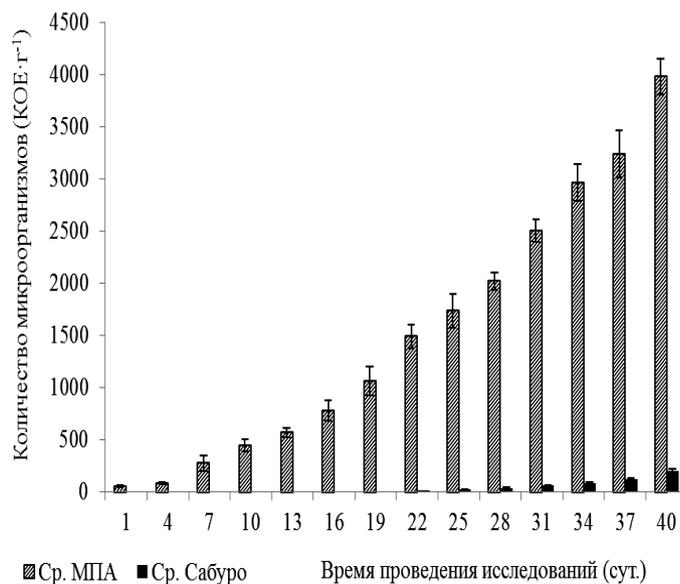
Table 2 Results of microbiological studies of environment of giant prawn larvae cultivation (tank № 2)

День проведения эксперимента	Количество микроорганизмов в воде		Количество личинок, шт.	Стадия личиночного развития (%)
	На среде МПА (ОМЧ) (КОЕ·мл ⁻¹)	На среде Сабуро (КОЕ·мл ⁻¹)		
1	56 ± 4	Роста нет	20000	I (100)
4	118 ± 11	Роста нет	19400	II (50) – III (35) – IV (15)
7	311 ± 47	Роста нет	18370	III (50) – IV (50)
10	488 ± 22	Роста нет	17400	IV (30) – V (70)
13	602 ± 51	Роста нет	16600	IV (5) – V (45) – VI (50)
16	883 ± 107	Роста нет	14200	VI (100)
19	1204 ± 83	Роста нет	12900	VI (45) – VII (55)
22	1670 ± 119	13 ± 5	10300	VII (100)
25	1930 ± 95	44 ± 7	8100	VII (65) – VIII (35)
28	2100 ± 86	59 ± 2	6740	VIII (50) – IX (50)
31	2710 ± 78	71 ± 8	4950	VIII (5) – IX (55) – IX (40)
34	3090 ± 66	98 ± 13	3000	IX (38) – X (57) – PI* (5)
37	3699 ± 102	141 ± 9	1800	X (60) – XI (26) – PI (14)
40	4140 ± 79	208 ± 25	1200	XI (69) – PI (31)
42			987	PI

*PI – Postlarvae (постличинка)

В период прохождения личинками IV – VI стадий развития (4 – 13 сут.) микробное число воды не превышало 1000 КОЕ·мл⁻¹. На среде Сабуро роста микроорганизмов в этот период не отмечено.

На 19 сутки ОМЧ воды в инкубаторе №



2 (табл. 2) на два порядка превысило первоначальное значение, а обсеменённость личинок микроорганизмами составила 1063 ± 137 КОЕ·г⁻¹ (рис. 2). На среде Сабуро рост микроорганизмов зафиксирован только на 22 сут.

Рис. 2 Численность микроорганизмов, выделенных от личинок гигантской креветки (инкубатор № 2)

Fig. 2 The number of microorganisms isolated from the larvae of the giant prawn (tank № 2)

В течение всего периода исследования наблюдался равномерный рост микробного числа воды, а также равномерный отход личинок на всех стадиях развития. На 40-й день эксперимента ОМЧ воды относительно первоначального значения увеличилось в 74 раза. На 42-й день в инкубаторе № 2 мы получили 987 экз. постличинок, что составило 5% от первоначального количества личинок.

В инкубаторе № 3, в котором выполняли постоянную фильтрацию

и ежедневную замену 50 % воды, на четвертый день эксперимента личинки находились на III (55 %) и IV (45 %) стадиях развития (табл. 3). Их обсеменённость микроорганизмами была на уровне 64 ± 6 КОЕ·г⁻¹.

В 3-м инкубаторе в течение всего периода исследования наблюдался равномерный незначительный рост микробного числа воды, а также равномерный отход личинок на всех этапах метаморфоза (табл. 3).

Табл. 3 Результаты микробиологических исследований среды выращивания личинок гигантской креветки (инкубатор № 3)

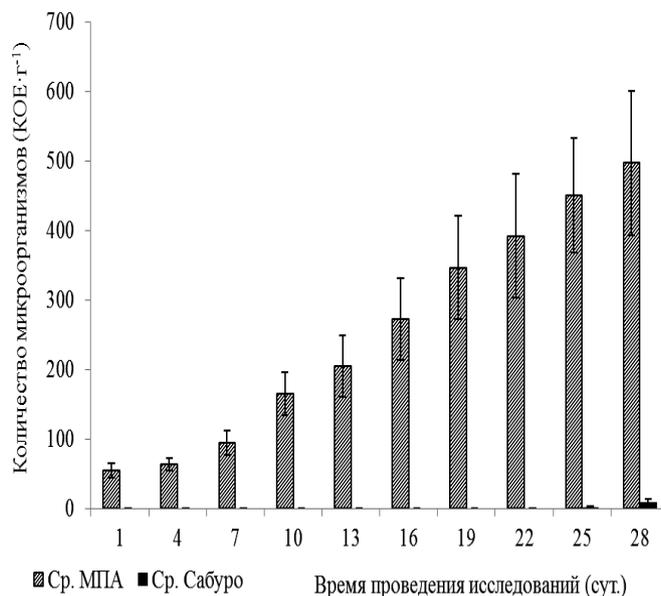
Table 3 Results of microbiological studies of environment of giant prawn larvae cultivation (tank № 3)

День проведения эксперимента	Количество микроорганизмов в воде		Количество личинок, шт.	Стадия личиночного развития (%)
	На среде МПА (ОМЧ) (КОЕ·мл ⁻¹)	На среде Сабуро (КОЕ·мл ⁻¹)		
1	56 ± 4	Роста нет	20000	I(100)
4	78 ± 2	Роста нет	19500	III(55) – IV(45)
7	104 ± 11	Роста нет	18720	IV(100)
10	198 ± 6	Роста нет	17350	IV(10) – V(90)
13	232 ± 17	Роста нет	16150	VI(100)
16	303 ± 14	Роста нет	14900	VI(30) – VII(60) – VIII(10)
19	379 ± 13	Роста нет	13090	VII(40) – VIII(55) – IX(5)
22	415 ± 9	Роста нет	11100	IX(65) – X(30) – PI(5)
25	477 ± 23	7 ± 2	9900	X(55) – XI(33) – PI(17)
28	502 ± 35	11 ± 5	7410	XI(58) – PI(42)
33			6200	PI

Рост на среде Сабуро был отмечен на 25 сут. Личинки из инкубатора № 3 все XI стадий развития прошли за 28 дней. На 28 день эксперимента ОМЧ воды увеличилось в 8.9 раз, а ОМЧ личинок креветки (498 ± 33 КОЕ·г⁻¹) – в 9.1 раза относительно первоначального значения (рис. 3). Нами получено 6200 экз. постличинонок, что составило 31% от первоначального количества личинок.

Рис. 3 Численность микроорганизмов, выделенных от личинок гигантской креветки (инкубатор № 3)

Fig. 3 The number of microorganisms isolated from the giant prawn larvae (tank № 3)



Обсуждение. Анализ полученных нами данных показал, что при отсутствии фильтрации и ежедневной замены воды в инкубаторе № 1 уже на 7 сутки эксперимента ОМЧ воды возросло практически в 71 раз.

В это время основная масса личинок проходила II (50 %) – III (45 %) стадии развития и только 5 % личинок находились на IV стадии. В инкубаторе № 2, где использовалась только фильтрация воды, на 7 сутки ОМЧ воды было в 12.8 раз меньше, чем в инкубаторе № 1, а 50 %

личинки находилось на IV стадии развития. В инкубаторе № 3, где вода фильтровалась и осуществлялась её ежедневная 50 % замена, микробное число воды на 7 день исследований оказалось в 38.2 раза меньше, чем на тот же день в инкубаторе № 1, и в 3 раза меньше, чем в инкубаторе № 2. На 7 день в инкубаторе № 3 все личинки находились на IV стадии развития.

На 13 день эксперимента в инкубаторе № 1 в воде отмечены сливной рост микроорганизмов на среде МПА, а также максимальный отход личинок, находившихся на III – IV стадии развития. Через сутки все личинки в инкубаторе № 1 погибли. В тот же период в инкубаторе № 2 основная масса личинок проходила V (45 %) – VI (50 %) стадии развития и всего 5% – IV стадию, а в инкубаторе № 3 личинки были уже на VI стадии. На 13 сутки в инкубаторе № 2 ОМЧ воды было в 2.6 раз больше, чем в инкубаторе № 3.

В дальнейшем наблюдалась задержка развития личинок в инкубаторе №2. На 28 сутки они проходили VIII (50 %) – IX (50 %) стадии развития, тогда как на тот же день в инкубаторе № 3 личинки были на XI стадии.

На 33 сутки исследований в 3-м инкубаторе в результате метаморфоза были получены постличинки в количестве 6200 экз., что составило 31 % от первоначального количества личинок. В инкубаторе № 2 метаморфоз личинок завершился на 42 сут., мы получили 987 экз. постличинок (5 % от первоначального количества личинок).

Таким образом, в результате проведённых исследований установлено, что при общем микробном числе воды, не превышающем 502 ± 35 КОЕ·мл⁻¹, все стадии личиночного развития гигантская креветка проходит в течение 33 суток. При увеличении ОМЧ воды до 4140 ± 79

КОЕ·мл⁻¹ время прохождения личиночных стадий увеличивается до 42 суток, а выживаемость креветки снижается, составляя 5 %.

Выводы. 1. При отсутствии фильтрации и смены воды уровень ОМЧ морской воды в инкубаторе выращивания личинок гигантской креветки за 10 дней возрастает в 173 раза, при использовании постоянной фильтрации воды – в 74 раза. Наименьший рост бактериального загрязнения морской воды (в 9 раз) отмечается при постоянной фильтрации и ежедневной замене не менее 50 % объёма воды. 2. Бактериальное загрязнение морской воды оказывает значительное влияние на развитие и выживаемость личинок гигантской креветки. При 502 КОЕ·мл⁻¹ все стадии личиночного развития креветки проходят в течение 33 сут., а выживаемость от первой стадии до постличинки составляет 31 %, что соответствует нормам коммерческого получения личинок гигантской пресноводной креветки в питомнике. Увеличение ОМЧ морской воды до 4140 КОЕ·мл⁻¹ снижает процент выхода постличинок креветки до 5 % и приводит к возрастанию периода метаморфоза личинок до 42 сут. Возрастание микробного числа воды до 9702 КОЕ·мл⁻¹ приводит к 100 % гибели личинок на ранних стадиях развития.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность и признательность проф. Гаевской А. В. за ценные замечания, высказанные при редактировании данной работы.

1. Андреева Н. А. Микробиологические методы исследования морских животных и среды их обитания. – Севастополь, 2010. – 100 с.
2. Аникиев В. В., Лукомская К. А. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Учебное пособие для студентов биологических специ-

- альностей пед. институтов. – М.: Просвещение, 1997. – 128 с.
3. Ковачева Н. П. Аквакультура ракообразных отряда Decapoda: камчатский краб *Paralithodes camtschaticus* и гигантская пресноводная креветка *Macrobrachium rosenbergii*. – М.: Изд-во ВНИРО, 2008. – 240 с.

4. Пономарев С. В., Лагуткина Л. Ю., Киреева И. Ю. Фермерская аквакультура: Рекомендации. – М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2007. – 192 с.
5. *Продукты пищевые*. Методы культивирования микроорганизмов: ГОСТ 26670-91. – Взамен ГОСТ 26670-85. – [Введен 01.01.1993]. – М.: Стандартинформ, 2003. – 3 с.
6. *Продукты пищевые*. Метод определения дрожжей и плесневых грибов: ГОСТ 10444.12-88. – Взамен ГОСТ 10444.12-75, ГОСТ 10444.13-75, ГОСТ 26888-86. – [Введён 01.01.1990]. – М.: Стандартинформ, 2010. – 301 с.
7. Сальников Н. Е., Суханова М. Э. Разведение и выращивание пресноводных креветок на юге России. – Астрахань, 2000. – 230 с.
8. Статкевич С. В., Шишова В. В. Определение чувствительности патогенной микрофлоры личинок гигантской креветки *Macrobrachium rosenbergii* к антибиотикам // Заповедники Крыма: Матер. VI межд. научно-практич. конф. (Симферополь, 20 – 22 октября 2011 г.). – Симферополь, 2011. – С. 353 – 356.
9. Хмельва Н. Н. Экология пресноводных креветок. – Минск: Беларуская навука, 1997. – 254 с.
10. Akintola S. L., Bakare S. B. Microbiological changes in freshwater prawn (*Macrobrachium vollenhovenii*, Herklots 1857) stored in ice // Amer. J. Food Techn. – 2011. – 6 (6). – P. 500 – 506.
11. Aquacop *Macrobrachium rosenbergii* de Man Culture in Polynesia: progress in developing a mass intensive larval rearing technique in clear water // Proc. World Maricult. Soc. – 1977. – 8. – P. 311 – 326
12. Sinderman Carl J., Lightner Donald V. Disease and husbandry problems of cultured *Macrobrachium rosenbergii*. // Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture, 1988. – P. 134 – 180.
13. Yang Xianle, Huang Yanping The status and treatment of serious diseases of freshwater prawns and crabs in China // Aquaculture Asia, 2003. – 8, No.3. – P. 19 – 24.
14. Yathavamoorth R., Surendrara A., Sabeena K. H. Farvin. Enteric bacteria and water quality of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) in culture environment from Kerala, India // J. Fish. Aquat. Sci. – 2010. – 23. – P. 73 – 84.

Поступила 07 июля 2014 г.

После доработки 10 октября 2014 г.

Вплив бактеріального забруднення середовища вирощування на розвиток і виживання личинок гігантської прісноводної креветки *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). С. В. Статкевич. Вивчено зростання бактеріального забруднення морської води при різних умовах культивування личинок гігантської креветки *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). Виявлено вплив ступеня накопичення бактеріальної мікрофлори в середовищі на строки розвитку і виживання личинок. Визначено межі оптимального для культивування рівня мікробного забруднення середовища, перевищення якого негативно позначається на темпах личинкового розвитку креветки.

Ключові слова: гігантська прісноводна креветка, *Macrobrachium rosenbergii*, личинкові стадії, бактеріальне забруднення, аквакультура

Effect of bacterial contamination of the environment of cultivation on the development and survival of larvae of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). S. V. Statkevich. The growth of bacterial contamination of sea water under different conditions of cultivation of larvae of the giant prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) is studied. The influence of the degree of accumulation of bacterial microflora in the environment on development and survival of larvae is determined. Defined the boundaries of the optimal level of microbial contamination of the environment for cultivation, above which adversely affects the rate of larval development of the prawn.

Key words: the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, larval stage, bacterial contamination, aquaculture