

А. Н. ХАНАЙЧЕНКО¹, М. И. ПЛАНАС², Д. Г. КАРНЕРО²

РОСТ, ВЫЖИВАЕМОСТЬ И ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ЛИЧИНОК ТЮРБО (*Scophthalmus maximus* L.) ПРИ ИНТЕНСИВНОМ ВЫРАЩИВАНИИ В «ЧИСТОЙ» И «ЗЕЛЕННОЙ» ВОДЕ

Проведено сравнение роста, выживаемости и химического состава личинок тюрбо (*Scophthalmus maximus*) в первые две недели развития при интенсивном выращивании в «чистой» и «зеленой» (внесение смеси микроводорослей *Tetraselmis suecica* и *Isochrysis galbana*) воде и питании (последовательно) коловратками и науплиями артемий.

Существуют два основных метода выращивания личинок рыб: в «чистой» (очищенной фильтрацией и УФ обработкой) и «зеленой» (с добавлением морских микроводорослей) воде. Общеизвестно, что некоторые морские микроводоросли, добавленные в выростные системы, улучшают начало питания, обеспечивают лучшую пигментацию, рост и выживаемость личинок рыб [7]. Однако причины их положительного влияния полностью не выяснены. При искусственном выращивании личинок тюрбо - *Scophthalmus maximus* L. (сем. *Scophthalmidae*) их основная смертность происходит в первые две недели развития [5, 6], в период кормления живыми кормами - коловратками и артемиями.

Цель данной работы: изучить влияние присутствия в воде микроводорослей на рост, выживаемость и химический состав личинок тюрбо на ранних стадиях развития до начала метаморфоза. Работа проведена на личинках одной партии на экспериментальной базе Института морских исследований г. Виго (Испания).

Материал и методика. Методы культивирования. Микроводоросли Prasinophyceae - *Tetraselmis suecica* и Prymnesiophyceae - *Isochrysis galbana* (T-Iso) культивировали на среде Уолна при $23 \pm 1^\circ\text{C}$ и постоянном освещении флуоресцентными лампами дневного света ($63,2 \mu\text{E} \cdot \text{м}^{-2}$; 4000 люкс). Использовали их при достижении концентрации $5 \cdot 10^6 \text{ кл} \cdot \text{мл}^{-1}$ в экспоненциальной фазе роста. Коловраток *Brachionus plicatilis* выращивали при $23 \pm 1^\circ\text{C}$ на пекарских дрожжах (*Saccharomyces cerevisiae*) и насыщали в течение 6 ч в смеси *T. suecica* и *I. galbana* перед внесением в выростные бассейны из расчета 5 экз $\cdot \text{мл}^{-1}$. Плотность науплиев артемий («*Argentemia*, Gold») поддерживали на уровне 0,5 экз $\cdot \text{мл}^{-1}$.

Личинок тюрбо помещали в выростные цилиндрикоконические емкости, при начальной плотности 50-70 экз $\cdot \text{л}^{-1}$. Выращивание личинок проводили при температуре $18 \pm 0,5^\circ\text{C}$ и постоянном освещении 200 люкс на поверхности, в «чистой» (ЧВ/CW) и «зеленой» воде (ЗВ/GW), с добавлением микроводорослей 10^4 - $10^5 \text{ кл} \cdot \text{мл}^{-1}$ в смеси *T. suecica* и *I. galbana* (1:1). На 3 и на 5 сутки в выростные емкости вносили смесь антибиотиков (50.000 ед $\cdot \text{л}^{-1}$ натриевой соли пенициллина и 50 мг $\cdot \text{л}^{-1}$ сульфата стрептомицина). Каждые 2 суток производили 25-50% замену воды.

Аналитические методы. Сухую массу и химический состав определяли у личинок следующих групп: 2-суточных (D2) - до перехода на внешнее питание коловратками; 9-суточных (D9) - перед началом кормления артемиями; 13-суточных (D13) - питающихся науплиями артемий. Сухую массу личинок определяли весовым методом (Sartorius-MP3; $\pm 1 \text{ мкг}$) после высушивания проб (в каждой пробе в 2 повторностях по 50 экз. - D2 и D9 и по 30 экз. - D13) в течение 24 ч при 60°C . Для определения химического состава использовали по 400 экз. личинок D2 и D9 и 250 экз. - D13 в 2 повторностях, которых отмывали дистиллированной водой, быстро замораживали жидким азотом и сохраняли при -40°C до момента проведения анализов. Химический состав личинок определяли по стандартным модифицированным методикам [1, 4, 5].

Удельную скорость роста (SGR, сут⁻¹) рассчитывали по формуле:
$$\text{SGR} = \frac{\ln W_T - \ln W_0}{T}$$

где W_0 - сухая масса (содержание углеводов, белка, липидов), в мкг, личинок перед началом экзогенного питания, мкг; W_T - сухая масса (содержание углеводов, белка, липидов), в мкг, в момент времени T (сут).

Выживаемость личинок в течение эксперимента определяли на 14 сутки, рассчитывая ее как процентное соотношение количества жизнеспособных особей в конце эксперимента к количеству особей, посаженных в бассейн, и принимая во внимание количество особей, отобранных в ходе эксперимента для химических анализов.

Результаты. Наибольшие различия между группами личинок из «чистой» (ЧВ) и «зеленой» (ЗВ) воды, обнаружены в выживаемости и в весовом росте. Выживаемость тюрбо в возрасте от 1 до 14 суток в ЧВ составила 37,8%, в ЗВ - 63,5%. Сухая масса личинок при выращивании до 13 суток от начальных 31,8 мкг (2 сут) возрастала в ЧВ в 6 раз (191,5 мкг), в ЗВ в 11 раз (349,0 мкг). SGR сухой массы личинок за этот период составила в «чистой» и в «зеленой» воде в среднем 0,16 и 0,22 сут⁻¹, соответственно.

SGR сухой массы и абсолютного содержания химических компонентов (СН, РР, LI) в личинках тюрбо из ЗВ и ЧВ варьировала в разные фазы выращивания (табл.1): во время питания только коловратками (2-9 сут) (фаза 1) и в период перехода на питание артемиями (9-13 сут) (фаза 2). SGR углеводов личинок в течение фазы 1 составило 0,21/0,27 в ЧВ/ЗВ, соответственно, в течение фазы 2 было одинаковым в ЧВ/ЗВ - 0,18 сут⁻¹; SGR белков составил 0,15/0,20 (фаза 1) и 0,18/0,21 (фаза 2); SGR липидов - 0,11/0,17 (фаза 1) и 0,21/0,24 (фаза 2), соответственно.

Таблица 1 Удельная скорость роста SGR (сут⁻¹) личинок тюрбо при выращивании в «чистой» и «зеленой» воде
Table 1 SGR (сут⁻¹) of turbot larvae in «clear» and «green» water

SGR, сут ⁻¹	D2-D9*		D9- D13	
	ЧВ/CW	ЗВ/GW	ЧВ/CW	ЗВ/GW
Сухой массы личинок (Dry weight)	0,15	0,22	0,18	0,22
Углеводов (Carbohydrates)	0,21	0,27	0,18	0,18
Белков (Protein)	0,15	0,20	0,18	0,21
Тотальных липидов (Total lipids)	0,11	0,17	0,21	0,24

Условные обозначения в табл. 1-4 см. в «Материал и методика»

Таблица 2 Химический состав личинок тюрбо при выращивании в «чистой» и «зеленой» воде
Table 2 Chemical composition of turbot larvae in «clear» and «green» water

Органические соединения	D2*	D9	D9	D13	D13
		ЧВ/CW	ЗВ/ GW	ЧВ/ CW	ЗВ/ GW
	% Органического вещества				
Углеводы (Carbohydrates)	5,0	8,22	8,46	8,02	7,24
Белки (Protein)	66,92	69,52	68,23	66,77	67,46
Тотальные липиды (Total lipids)	28,07	22,25	23,31	25,20	25,30

абсолютном (мкг/личинку) и относительном (% органического вещества) содержании нейтральных липидов представлены в табл. 3. В целом, возрастало абсолютное содержание трех классов - TAG, FFA и S, а относительное - только FFA. На 9 сут абсолютное содержание TAG, FFA и S у личинок из ЗВ и ЧВ различалось незначительно, относительное же оказывалось значительно ниже у личинок из ЗВ. Содержание SE+W было значительно ниже у личинок из ЗВ по сравнению с ЧВ как в абсолютных, так и относительных значениях. На 13 сут различия в относительном содержании TAG, FFA и SE+W личинок из ЗВ и ЧВ нивелируются, но содержание S выше у личинок группы ЗВ.

При содержании в ЗВ относительное содержание углеводов в органическом веществе личинок возрастало в течение фазы 1 (с 5 до 8%) и незначительно снижалось в течение фазы 2 (табл.2). Относительное содержание белка в органическом веществе личинок незначительно колебалось в течение всего периода (66,8-69,5%). Относительное содержание тотальных липидов также снижалось синхронно в течение фазы 2 в обеих группах с 28 до 22-23%, повышаясь к концу фазы 2 до 25%.

Изменения в

Таблица 3 Изменения классов липидов личинок тюрбо при выращивании в «чистой» и «зеленой» воде

Table 3 Changes in the lipid classes of turbot larvae in «clear» and «green» water

Классы липидов	D2		D9				D13			
	1*	2**	ЧВ/CW		ЗВ/GW		ЧВ/CW		ЗВ/GW	
			1	2	1	2	1	2	1	2
TAG	1,15	4,7	2,29	3,1	2,79	2,6	3,03	2,0	8,08	2,3
FFA	0,30	1,3	1,80	2,5	2,02	1,9	6,14	4,0	2,16	4,3
SE+W	1,59	6,6	2,23	3,0	1,79	1,7	1,45	1,0	2,27	0,9
S	0,67	2,7	1,92	2,6	2,16	2,0	3,70	2,4	7,32	2,9

* мкг/лич; ** % органического вещества личинок

В жирнокислотном (ЖК) составе тотальных липидов личинок обеих групп до начала внешнего питания (D2) насыщенные, моноеновые и полиеновые кислоты представлены практически поровну; семейства ЖК преобладают в нисходящем порядке: (n-3)>(n-9)>(n-7)>(n-6) (табл.4). В ЖК составе преобладают пальмитиновая 16:0 (21,4%), олеиновая 18:1n9 (16,7%) и докозагексаеновая 22:6n3 (16,6%). Со 2 по 9 сут в обеих группах личинок наблюдали возрастание доли моноеновых кислот (за счет пальмитоолеиновой 16:1n7 и олеиновой 18:1n9), а также снижение доли насыщенных (за счет 16:0) и полиеновых (за счет ВНЖК - 20:5n3 и 22:6n3). С 9 по 13 сут происходит резкое возрастание линоленовой 18:3n3. Преобладание семейств ненасыщенных ЖК в липидах личинок смещается (n-9)>(n-3)>(n-7)>(n-6).

Таблица 4 Жирнокислотный состав тотальных липидов личинок тюрбо (% ЖК)

Table 4 Area percent of total lipids fatty acids of turbot larvae

% суммы ЖК	D2	D9 ЧВ/CW	D9 ЗВ/GW	D13 ЧВ/CW	D13 ЗВ/GW
16:0	21,41	15,45	16,00	15,83	17,83
16:1n7	4,99	9,26	8,88	4,77	4,81
18:1n9	16,71	21,83	20,78	22,43	22,45
18:3n3	1,02	2,50	3,11	14,29	14,34
20:5n3	5,37	3,14	2,57	2,72	2,13
22:6n3	16,55	6,39	4,01	1,61	0,54
DHA/EPA	3,08	2,03	1,56	0,59	0,25
Насыщенные	34,16	30,20	32,16	27,35	30,31
Моноеновые	34,10	45,88	43,15	41,48	40,69
Полиеновые	31,73	23,92	24,69	31,17	29,00
n-3	28,01	16,82	15,39	22,44	20,35
n-6	3,72	7,10	9,31	8,72	8,65
n-7	9,08	16,07	15,96	13,78	14,24
n-9	22,77	28,08	25,62	26,67	25,63
ПНЖК n-3	25,81	12,78	10,19	6,17	3,93
n-3/n-6	7,53	2,37	1,65	2,57	2,35
n-9/n-3	0,81	1,67	1,67	1,19	1,26

В ЖК составе личинок из «зеленой» воды на 9 сут было отмечено значительно более высокое содержание n-6 и более низкое - n-9 и ВНЖК n-3. Тенденции изменения соотношений n-3/n-6 и n-9/n-3 в ЖК составе личинок оказались практически одинаковыми для обеих групп на протяжении 2-13 суток: n-3/n-6 снижалось со 2 до 9 сут, и несколько возрастало к 13 сут, n-9/n-3 возрастало вдвое к 9 сут, и незначительно снижалось к 13 сут.

Обсуждение В результате применения антибиотиков в нашем эксперименте влияние на выживаемость личинок патологической микрофлоры было сведено до минимума. Поэтому можно предположить, что присутствие микроводорослей оказывало положительный эффект на выживаемость и рост личинок, влияя на их метаболизм.

Общие закономерности изменений химического состава личинок в онтогенезе заключаются в том, что в возрасте 2-9 сут наблюдается процесс преимущественного

накопления углеводов и белков по сравнению с липидами, а в возрасте 9-13 сут происходит преимущественное накопление липидов.

Более высокие значения SGR для сухой массы личинок и всех химических компонентов, наблюдаемые у личинок из ЗВ по сравнению с ЧВ, свидетельствуют об усилении анаболизма углеводов, белков и липидов (в нисходящем порядке) в присутствии микроводорослей, особенно во время питания коловратками. Стабильные значения SGR для сухой массы личинок из ЗВ на протяжении всего эксперимента свидетельствуют о том, что влияние ЗВ продолжается и во время фазы питания артемиями, но преимущественно на белковый и липидный обмен.

Судя по изменениям в относительном содержании химических компонентов в органическом веществе личинок, именно нейтральные липиды (TAG и SE+W) можно считать основными энергетическими субстратами в 2-9 суточном возрасте (при питании только коловратками). Обнаруженный эффект снижения доли нейтральных липидов в личинках из ЗВ во время питания коловратками, очевидно, аналогичен эффекту снижения аккумуляции липидов и доли триглицеридов в мышцах и жировых тканях айю, *Plecoglossus altivelis* [2], в результате усиления липолиза в тканях [3] в присутствии в пище рыб хлорелльного экстракта. При переходе личинок на питание науплиями артемий, одинаковыми по химическому составу (в ЗВ и ЧВ), происходит постепенное снижение эффекта «зеленой» воды на метаболические процессы, приводящее к сходному относительному содержанию TAG, FFA и SE+W в теле личинок из ЗВ и ЧВ.

Повышение уровня свободных жирных кислот в органическом веществе личинок также свидетельствует о том, что основным катаболическим субстратом на протяжении ранних стадий личиночного развития тюрбо являются преимущественно нейтральные липиды [5]. Ранее было обнаружено, что в группах личинок с более высокой выживаемостью энергетические липиды играют важную роль в метаболизме личинок, о чем свидетельствует высокий уровень свободных жирных кислот [4, 5].

Изменения ЖК состава липидов личинок отражают как онтогенетические закономерности, так и влияние смены кормовых организмов при выращивании, и совпадают с результатами, полученными в предыдущих исследованиях [6]. До начала экзогенного питания в ЖК составе липидов доминируют 16:0, 18:1n9 и 22:6n3. Значительное снижение уровня 16:0 у личинок тюрбо со 2 по 13 сутки связаны с их интенсивным использованием в процессе раннего онтогенеза. С началом экзогенного питания состав пищевых организмов, потребляемых личинками, оказывает влияние на общие тенденции изменения ЖК состава соответственно составу живых кормов: в возрасте D2-D9 - преобладанию 16:1n7 и 18:1n9 в коловратках и в возрасте D9-D13 - преобладанию 18:1n9 и 18:3n3 в науплиях артемий, для которых характерно также полное отсутствие 22:6n3 в ЖК составе, что приводит к снижению 22:6 n3 в личинках.

Более высокое содержание кислот семейства n-6 в личинках из ЗВ по сравнению с ЧВ во время фазы питания коловратками, возможно, связано со снижением доли нейтральных липидов, для которых характерно низкое содержание n-6 по сравнению с фосфолипидами, и сопутствует, по-видимому, повышению доли фосфолипидов в тотальных липидах личинок ЗВ.

Более низкое содержание ВНЖК (n-3) в личинках из ЗВ, очевидно, объясняется результатом лучшего усвоения коловратками из смеси двух микроводорослей более крупных микроводорослей *Tetraselmis suecica*, с низким содержанием 22:6n3, по сравнению с *Isochrysis galbana* [7]. Снижение относительного содержания 22:6n3 на фоне возрастания 18:1n9 свидетельствует об отсутствии фактора голодания личинок.

Несмотря на то, что ряд исследователей находил положительную корреляцию между выживаемостью и ростом личинок и содержанием и соотношением в них 22:6n3 и 20:5n3 (важнейших предшественников эйкозаноидов, эссенциальных кислот, не синтезируемых из предшественников в организме личинок тюрбо), в данном исследовании корреляции между ростом и выживаемостью и концентрацией и пропорцией

данных ВНЖК (n-3) в теле личинок тюрбо исследованного возрастного периода обнаружено не было.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в присутствии микроводорослей в системе выращивания изменяется метаболизм личинок тюрбо, повышается скорость их весового роста в результате усиленного анаболизма углеводов, белков и липидов. В органическом веществе личинок из «зеленой» воды в период питания коловратками снижается содержание нейтральных липидов, в ЖК составе снижается содержание семейств n-9 и повышается n-6. Несмотря на то, что у личинок из ЗВ обнаружено более низкое содержание n-3 и ВНЖК n-3, выживаемость личинок до начала метаморфоза при применении методики «зеленой» воды повышается практически вдвое по сравнению с «чистой» водой.

1. Keūnc M. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. – М., 1975. – 322 с.
2. Nematipour G.R., Nakagawa H., Nanba K. et al. Effect of *Chlorella* -extract supplement to diet on lipid accumulation of ayu // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. - 1987. - 53, № 9. - P. 1687 - 1692.
3. Nematipour G.R., Nakagawa H., Ohya S. Effect of *Chlorella* -extract supplementation to diet on in vitro lipolysis in ayu // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. - 1990. – 56, № 5. - P. 777 - 782.
4. Planas M., Fereiro M.J., Fernandez-Reiriz M.J. et al. Evolucion de la composicion bioquimica y actividades enzimaticas en huevos de rodaballo *Scophthalmus maximus* L. durante la embriogenesis // Aquicultura Intermareal. Inst. Cien. Mar. Andalucia. Cadiz. - 1989. - P.215 - 227.
5. Planas M., Lambarta U., Fernandez-Reiriz M.J. et al. Chemical changes during development in turbot (*Scophthalmus maximus*) eggs and larvae // Phys. & Bioch. Aspects of Fish Development. Walter. R.T. and H.J. Fyhn (Eds.). - Univ. of Bergen., Norway, 1993. - Part IV: Osmoregulation & Bioenergetics. - P. 269-278.
6. Planas M., Garrido J.L., Labarta U. et al. Changes of fatty acid composition during development in turbot (*Scophthalmus maximus*) eggs and larvae // Phys. & Bioch. Aspects of Fish Development. Walter. R.T. & Fyhn H.J. (Eds.). - Univ. of Bergen, Norway, 1993. - Part V: Metabolism and Growth. - P. 323 - 330.
7. Reitan K.I., Rainuzzo J.R., Oie G et al. Nutritional effects of algal addition in first-feeding of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae // Aquaculture. - 1993. – 118, № 3-4. - P. 257 - 275.

¹ Институт биологии южных морей НАНУ, г.Севастополь, Украина

² Институт морских исследований ЦСИК (ИМ CSIC), г.Вико, Испания

Получено 02.06.99

A.N.KHANAYCHENKO, M. PLANAS, D.G.CARNERO

GROWTH, SURVIVAL AND CHEMICAL COMPOSITION OF TURBOT, *SCOPHTHALMUS MAXIMUS* L. LARVAE REARED INTENSIVELY IN «CLEAR» AND «GREEN» WATER

Summary

Comparison of growth, survival, biochemical and fatty acid composition of two groups of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae intensively reared in «clear» and «green» (mixture of *Tetraselmis suecica* and *Isochrysis galbana*) was carried out from start of exogenous feeding onwards (1-14 days old) during the rotifer and artemia nauplii feeding phases. Larvae specific growth rate, SGR on dry weight basis, was found 0,22 in «green» and 0,16 in «clear» water. Microalgae practically double survival (63,5% - в «green» and 37,8% - в «clear» water), reduced the quota of neutral classes, increasing n-6 and decreasing n-9 families in the total lipids of the larvae during the rotifer feeding. No correlation between the DHA/EPA contents in the larvae and their survival and growth was found.