

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА ДЛЯ АКТИВАЦИИ ВЫКЛЕВА АРТЕМИИ *ARTEMIA SP.*

Н.В. Кряхова, Н.П. Ковачева

Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства
и океанографии (ВНИРО), Москва, nvkryachova@mail.ru

В аквакультуре одним из самых ответственных этапов, определяющих дальнейший успех выращивания рыб и ракообразных, является период раннего развития. На этом этапе основную задачу составляет правильный подбор стартовых кормов. Наряду с комбикормами используются живые корма, среди которых наиболее часто применяют суточные науплии жаброногого рачка *Artemia sp.* Этот вид корма имеет ряд несомненных преимуществ таких, как высокое содержание белков и липидов с полиненасыщенными жирными кислотами (Ивлева, 1969; Devresse et al., 1990), а также относительная простота инкубации науплиев и возможность их получения непосредственно перед скармливанием.

При инкубации цист артемии выклев науплиев может быть относительно невысоким. Для стимуляции выклева часто используют различные способы активации. Одним из наиболее распространенных активаторов является раствор пероксида водорода. На данный момент существует два способа использования пероксида водорода в качестве активатора выклева: вымачивание цист в растворе и добавление активатора непосредственно в раствор. Первый способ применяется чаще. Однако при таком методе расход активатора очень велик. В литературных источниках приведены различные данные об оптимальном количестве пероксида водорода, необходимого для добавления в инкубационный раствор, но в каждом источнике приведено свое оптимальное количество активатора. Согласно этим данным необходимое количество активатора составляет до 1 мл на литр инкубационного раствора (А.с. 712065..., 1980; Литвиненко и др., 2009). Различия в количестве пероксида водорода, рекомендованного для активации, можно объяснить тем, что оптимальное количество активатора зависит от качества конкретной партии цист артемии, для которой он используется. Целью данной работы было проверить эту гипотезу, а также определить оптимальное количество активатора в инкубационном растворе для повышения выклева науплиев артемии.

Материал и методика

Проведено два эксперимента по определению воздействия раствора пероксида водорода на выклев артемии.

Определение оптимального количества активатора. Исследованы две партии цист артемии. Цисты размещали в 1,5-литровых инкубационных емкостях, установленных в термостатирующий аквариум, поддерживающий температуру

на уровне 28 °С. Было сформировано 6 вариантов, различающихся количеством вносимого активатора на 1 литр инкубационного раствора: 0,4, 0,8, 1,2, 1,6, 2,0 мл/л и контроль (без внесения активатора). Активатором являлся 3% раствор пероксида водорода. Каждый вариант эксперимента выполнен в трех повторностях. Инкубационный раствор представлял собой пресную воду с добавлением поваренной соли. Соленость раствора составила 30‰. Спустя 24 часа из каждой емкости отбирали 10 проб объемом 1 мл, пробы фиксировали 6% раствором формальдегида и просматривали под бинокулярным микроскопом МБС-9. Эксперимент проведен для каждой партии цист.

Влияние избыточных количеств раствора пероксида водорода. Материалом послужили цисты артемии партии 1. Сформировано 3 варианта, отличавшихся количеством вносимого в инкубационный раствор пероксида водорода: 0,4 (контрольный вариант), 4 и 8 мл/л. Каждый вариант выполнен в трех повторностях. Методика приготовления раствора и инкубации соответствовала описанной выше.

В обоих экспериментах отмечали количество различных степени вылупления в каждой пробе: невыклюнувшихся цист, частично покинувших оболочку цист науплиев («парашюты»), науплиев во внутренней оболочке и свободно плавающих науплиев. В каждой пробе выклев определяли как соотношение науплиев (свободно плавающих, «парашютов» и во внутренней оболочке) к сумме всех объектов, включая невыклюнувшиеся цисты. Результаты обработаны в программах Microsoft Excel и Statistica 6.0. Достоверность различий определяли по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

После обработки проб получены результаты, представленные на рисунках ниже. В ходе определения выклева обнаружены закономерности, независимые от партии цист. Выклев в контрольных вариантах обеих партий без добавления активатора был ниже как минимум в 1,5 раза (рис. 1). Внесение пероксида водорода привело к увеличению выклева, при этом максимальный результат отмечен при внесении пероксида водорода в количестве 0,4 мл/л раствора: он составил $71,75 \pm 1,56\%$ для партии 1 и $90,69 \pm 2,78\%$ для партии 2 (рис. 1).

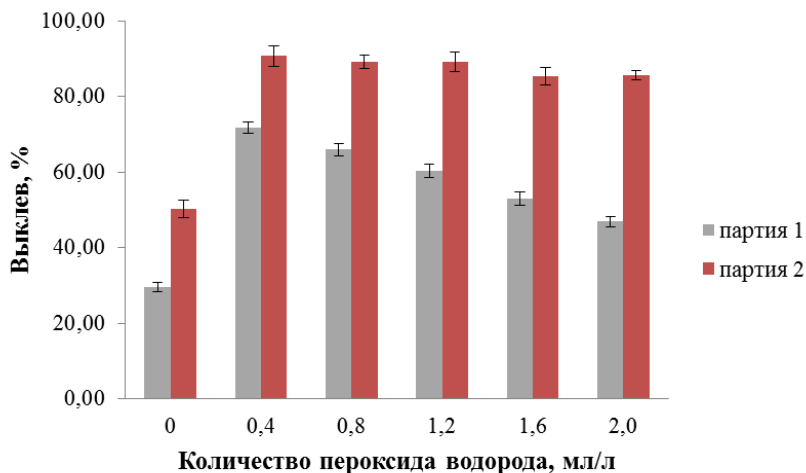


Рисунок 1 - Показатели выклева науплиев артемии в зависимости от количества пероксида водорода

Увеличение количества пероксида водорода приводит к снижению показателей выклева в обеих партиях. Однако при сравнении полученных результатов в динамике выклева двух образцов заметны различия. При инкубации партии 1 повышение количества пероксида выше 0,4 мл/л вызвало устойчивое снижение выклева, тогда как при инкубации второго образца показатели выклева во всех вариантах с добавлением активатора оставались очень близкими, и снижение было крайне незначительным.

После инкубации цист наиболее ценной составляющей раствора являются свободно плавающие науплии артемии. Находясь в толще воды, именно они служат кормом для разных видов гидробионтов. «Парашюты» и науплии, находящиеся во внутренней оболочке, в растворе постепенно опускаются на дно выростной емкости и по этой причине в большинстве случаев кормом не являются. Так как именно количество свободно плавающих науплиев может служить итоговой характеристикой эффективности выклева, рассмотрим каково соотношение тех составляющих инкубационного раствора, которые определяются как выклев (свободно плавающих науплиев, «парашютов» и науплиев, находящихся во внутренней оболочке) (рис. 2).

В контрольных вариантах обоих образцов, не подвергавшихся воздействию активатора, свободно плавающие науплии составляют основную часть. Доля же науплиев, оставшихся во внутренней оболочке, и «парашютов» крайне мала – не более 4,5%. Такое соотношение характерно для обеих партий артемии. С увеличением количества пероксида водорода доля свободно плавающих науплиев сокращается, а науплиев, находящихся во внутренней оболочке, и парашютов увеличивается.

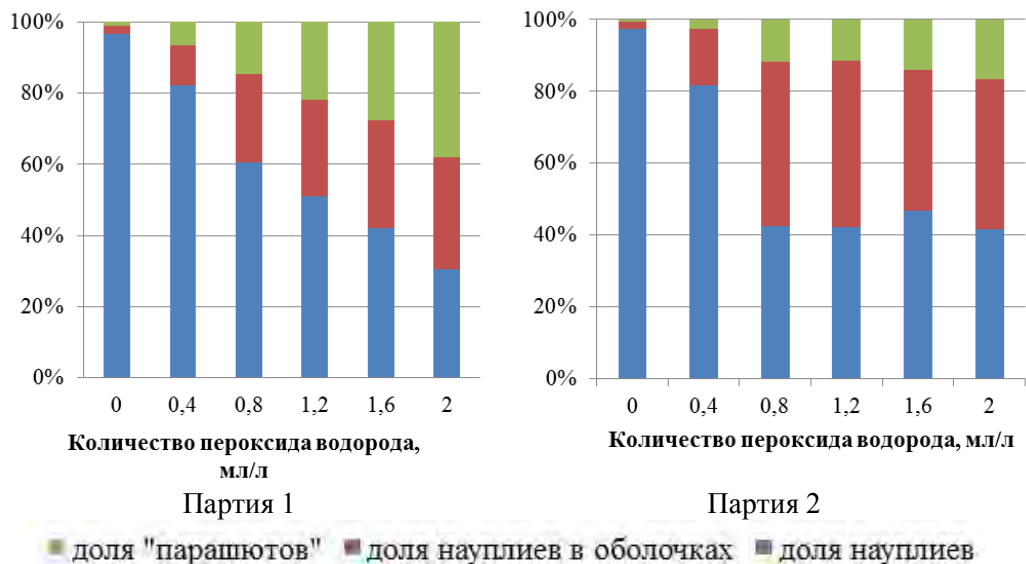


Рисунок 2 - Сравнение результатов выклева науплиев артемии двух партий цист

В литературных источниках упоминается механизм воздействия пероксида водорода на цисты артемии, основанный на том, что пероксид является источником кислорода в инкубационном растворе в виде его активной формы, поскольку по мере инкубации обогащения кислородом в молекулярной форме может быть недостаточным (Литвиненко и др., 2009). Дополнительное внесение кислорода способствует более активному вылуплению науплиев. Пероксид водорода представляет собой соединение, которое разлагается на воду и кислород под воздействием катализаторов. Катализаторами могут служить ионы некоторых металлов, а также такие ферменты, как каталаза и пероксидаза. Каталаза входит в состав клеточных мембран, поэтому при контакте цист артемии с пероксидом водорода возникает реакция разложения последнего (Мирошниченко, 1992). При этом происходит окисление внешней оболочки цисты, что облегчает науплиям выход из твердой оболочки. Видимо, в случае, когда в растворе содержится большее количество активатора, происходит воздействие уже на внутреннюю оболочку и, возможно, на сам науплиус. Это может привести к нарушению обменных процессов в организме науплиуса, что вызывает его угнетение и в дальнейшем гибель.

Это достаточно наглядно демонстрируют результаты эксперимента с избыточными количествами пероксида водорода (рис. 3).

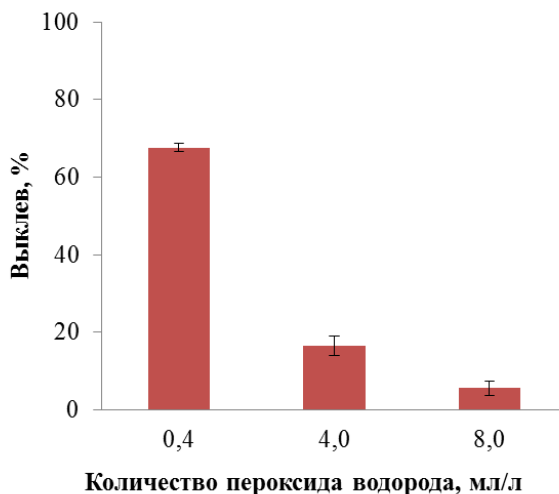


Рисунок 3 - Влияние избыточного количества активатора на выклев науплии артемии

В контрольном варианте эксперимента (0,4 мл/л) выклев артемии достаточно высок и составляет $67,7 \pm 1,16\%$, тогда как десятикратное увеличение количества активатора (4,0 мл/л) приводит к снижению выклева до $16,54 \pm 2,44\%$, а двадцатикратное (8,0 мл/л) – до $5,61 \pm 1,82\%$. Более того, при десятикратном увеличении активатора в инкубационном растворе находятся лишь единичные свободно плавающие науплии, а при двадцатикратном их нет вообще. В этих двух вариантах выклев составляют только науплии, находящиеся во внутренней оболочке, а также «парашюты». При этом, при повышении количества пероксида водорода количество науплиев во внутренней оболочке уменьшается, а «парашютов» - увеличивается.

Полученные в результате эксперимента данные подтверждают выраженную ранее гипотезу. Повышенное количество пероксида водорода вызывает сокращение количества свободно плавающих науплиев в растворе и увеличение доли «парашютов» и науплиев, находящихся во внутренней оболочке. Этот активатор способствует выходу науплиев из оболочки цисты. Однако, находясь в растворе в большом количестве, он воздействует на науплиус, в результате чего, науплиус прорывает оболочку цисты, но пройти через ткань внутренней оболочки ему не удастся.

Различия в полученных результатах выклева среди двух протестированных партий могут говорить о различной плотности внешней хитиновой оболочки цисты. Скорее всего, оболочка цист партии 2 более тонкая, и благодаря этому науплиям легче пройти сквозь нее. Следовательно, при повышенных количествах активатора

его воздействие на внутреннюю оболочку и на сам науплиус скажется быстрее. И это подтверждает меньшее количество свободно плавающих науплиев при повышении количества пероксида водорода.

Исходя из полученных данных по выклеву артемии при различных вариантах концентрации пероксида водорода, можно сказать, что минимальное содержание активатора в инкубационном растворе (0,4 мл/л) способствует наибольшему выклеву, а повышение его количества приводит к снижению показателя. Кроме того, для многих видов гидробионтов, для кормления которых используется артемия, важно постоянное нахождение кормовых объектов в толще воды, то есть, необходим тот вариант условий инкубации, при котором количество свободноплавающих науплиев максимально. Из протестированных нами вариантов количества пероксида водорода наиболее оптимальным является 0,4 мл активатора на литр инкубационного раствора, причем данный результат независим от качества цист артемии.

Литература

- А.с. 712065 (СССР) Способ активации яиц ракообразных / И.Б. Богатова, З.И. Шмакова, опубл. В БИ. – 1980. - №4.
- Ивлева И.В.* Биологические основы и методы культивирования кормовых беспозвоночных. М.: Наука, 1969. – 171 с.
- Литвиненко Л.И., Литвиненко А.И., Бойко Е.Г.* Артемия в озерах Западной Сибири. – Новосибирск, Наука, 2009. – 304 с.
- Мирошниченко О.С.* Биогенез, физиологическая роль и свойства каталазы. / Биополимеры и клетка, 1992. – Т.8. – №3. – С. 3-25.
- Devresse B., Romdhane M.S., Buzzi M., Rasomo J., Leger P., Brown J., Sorgeloos P.* Improved larviculture outputs in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* fed a diet of *Artemia* enriched with n-3 HUFA and phospholipids // World Aquaculture, 1990. – V.21. - №2. – P. 123-125.

ABSTRACT. The effect of 3% hydrogen peroxide solution on the *Artemia* sp. cysts was studied as a hatching activator. We examined the following amounts: 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 4.0 and 8.0 ml per liter of incubation solution. Two different batches of *Artemia* cysts were used for exploring the impact of batch quality on hatching. It was found that optimum amount of hydrogen peroxide providing the maximum hatching is 0.4 ml / liter of solution.