

## ЭФФЕКТ ОПТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НИЗКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ НА ДЕКАДНУЮ ВЫЖИВАЕМОСТЬ ЭМБРИОНОВ И ЛИЧИНОК РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ *in vitro*

М. С. ЛИМАН, Н. В. БАРУЛИН, В. Ю. ПЛАВСКИЙ

УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»,  
г. Горки, Могилевская область, Республика Беларусь, 213407

(Поступила в редакцию 20.09.2017)

**Резюме.** В работе приведены результаты исследований по влиянию оптического излучения низкой интенсивности на выживаемость эмбрионов и личинок радужной форели в условиях *in vitro* при различных температурных режимах. Как показали проведенные исследования, температурный режим выращивания объектов аквакультуры, даже в пределах оптимальных значений, способен оказывать эффект на величину стимулирующего эффекта оптического излучения. Полученные результаты создают перспективы для более эффективного использования оптического излучения низкой интенсивности в технологии аквакультуры ценных видов рыб.

**Ключевые слова:** оптическое излучение, личинки, радужная форель, выживаемость эмбрионов, температурный режим.

**Summary.** The paper presents the results of research into the effect of low-intensity optical radiation on the survival rate of rainbow trout embryo and larva *in vitro* under various temperature conditions. The research shows that the growing temperature regime of aquaculture objects can influence the optical radiation stimulatory effect. The obtained results open the door to the more efficient use of low-intensity optical radiation in the aquaculture of valuable fish species.

**Key words:** optical radiation, larvae, rainbow trout, embryo survival, temperature conditions.

**Введение.** В настоящее время в Беларуси активно развивается аквакультура в рыбноводных промышленных комплексах, работающих по технологии установок замкнутого водоснабжения (УЗВ). Так, только за последние годы в стране реализовано 13 проектов, направленных на создание УЗВ по выращиванию осетровых, лососевых, клариевых, угревых рыб [1, 2]. УЗВ позволяют повысить уровень интенсификации технологии воспроизводства большинства объектов аквакультуры.

Развитие технологии форелеводства и осетроводства является актуальным для Беларуси. В технологической цепочке выращивания товарной рыбы наиболее ответственным является этап получения рыбопосадочного материала. Промышленные методы выращивания, интенсификация производства и искусственные условия являются сильнейшими стрессовыми факторами для эмбрионального развития, приводя к снижению основных физиологических показателей, выживаемости и жизнестойкости на протяжении всей жизни рыбы, в т. ч. к появлению морфологических аномалий [3, 4].

Как отмечает Новиков [5], в пределах оптимального диапазона существует строгая зависимость количества нормально развитых вылупившихся зародышей от температуры.

В период эмбрионального развития рыб действие температурного фактора выражается, прежде всего, в изменениях скорости развития. Повышение температуры инкубации в пределах «нормы» вызывает сокращение продолжительности эмбрионального периода как в целом, так и отдельных его этапов. Например, у семги при инкубации икры в диапазоне температур от 1 до 12 °С в зависимости от выбранной температуры скорость эмбрионального развития повышается в 2–4 раза [5, 6].

В период эмбрионального развития в условиях промышленной аквакультуры необходимо осуществлять коррекцию развития с использованием различных факторов воздействия на организм.

Одним из таких факторов является низкоинтенсивное оптическое излучение, которое с успехом используется в медицине для лечения, коррекции и терапии в различных направлениях.

Как показали наши многолетние исследования, лазерное излучение, а также излучение сверхярких светодиодов оказывает стимулирующее воздействие на рыб и их половые продукты (икру и сперму), а также на развитие жаброногих рачков [1, 7, 8]. Однако наши предыдущие исследования основывались на воздействии оптического излучения на биообъекты в пределах одной температуры. Открытым остается вопрос о наиболее благоприятных температурных режимах, при которых проявляется максимальный эффект оптического излучения на объекты аквакультуры.

**Цель работы** – исследование влияния оптического излучения на эмбриональное и постэмбриональное развитие радужной форели в условиях *in vitro* при различных температурных режимах.

**Материал и методика исследований.** Исследования выполнялись на базе кафедры ихтиологии и рыбоводства и рыбоводного индустриального комплекса УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия».

Объектом исследований являлись однополые эмбрионы (оплодотворенная икра на стадии глазка) самок радужной форели, которые в процессе исследования переходили на стадию свободного эмбриона, а затем на стадию экзогенного питания.

Оплодотворенная икра на стадии глазка закупалась в рыбопотомнике Viviers de Sarrance (Франция), которая транспортировалась в термопластиковой таре со льдом на самолете. Затем икра проходила адаптацию в инкубационном цехе рыбоводного индустриального комплекса, работающим по принципу УЗВ, включающая в себя лотки для доинкубации, систему механической и биологической очистки, а также оксигенацию и обеззараживание воды УФ-облучением.

После двухсуточной адаптации эмбрионов (оплодотворенной икры на стадии глазка) в УЗВ инкубационного цеха формировались опытные и контрольные группы, которые помещались в отдельные чашки Петри и переносились в холодильник, где проходила их дальнейшая двухсуточная адаптация. Далее эмбрионы подвергались оптическому излучению (опытные группы), или не подвергались, но находились в идентичных условиях (контрольная группа). В качестве источника оптического излучения использовали полупроводниковый лазер (LD) фототерапевтического аппарата «Lotos» (красная область спектра  $\lambda = 650$  нм) разработанного в КБ «Люзар» и Институте физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси, а также матрицу светодиодных источников (LED) оптического прибора «Стронга» (красная область спектра  $\lambda = 630 \pm 10$  нм) разработанного в Белорусской государственной сельскохозяйственной академии и в Институте физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси. Воздействие на эмбрионы осуществляли в течении 5 дней по 20 минут в день, при плотности мощности  $3,0$  мВт/см<sup>2</sup>. После воздействия на эмбрионы оптическим излучением они незамедлительно возвращались в холодильник на соответствующую полку.

Для исследования влияния оптического излучения на выживаемость эмбрионов и личинок радужной форели при разной температуре в условиях отсутствия корма, было сформировано пять т. н. «температурных» исследуемых групп, включающих контрольную и опытные (LD и LED) группы в трех повторностях для каждой температуры: 8, 9, 10, 11, 12 °С. Регулирование температуры в исследуемых группах осуществлялось путем их помещения в холодильник на соответствующую полку по высоте.

В исследуемых группах ежедневно осуществлялась замена воды. Источником воды являлась артезианская скважина. Вода предварительно подвергалась обезжелезиванию, обеззараживанию (УФ-облучением) и температурному выравниванию.

Контроль за выживаемостью осуществляли путем ежедневной регистрации количества живых и мертвых личинок в исследуемых группах. Мертвые личинки после регистрации утилизировались.

На основании полученных данных по количеству живых и мертвых личинок осуществляли расчет декадной динамики средней выживаемости в течение эксперимента.

Для статистической обработки результатов использовали программную среду R [9], включая пакеты R Commander [10], RCMR [11] и др. Статистическую достоверность различий оценивали по тесту Тьюки при условии соблюдения нормальности распределения данных (оценивалось тестом Шапиро-Уилка) и однородности групповых дисперсий (оценивалось тестом Ливина). При несоблюдении указанных условий использовали непараметрический тест Ньюмена-Кейлса. Для оценки качественных признаков использовали критерий  $\chi^2$  («хи-квадрат»). Для построения обобщенной линейной модели использовали функцию `glm()` в статистической среде R, которая имела вид: `glm(formula, data = data.frame, family = family.generator)`. Для сравнения качества построенных моделей использовали девианс статистику (deviance), непосредственно вытекающую из оценок метода максимального правдоподобия (MLE, maximum likelihood estimation). Для проверки различий в повторностях эксперимента использовали логранговый критерий и тест Гехана-Вилкоксона в модификации Пето (Peto).

Для оценки влияния оптического излучения на декадную динамику средней выживаемости эмбрионов и личинок радужной форели в течение эксперимента осуществляли построение обобщенной линейной модели GLM (Generalized Linear Model). Для выбора типа функции GLM-модели мы сравнили

между собой две возможные модели и оценили их по величине АИС-критерия (информационный критерий Акаике АИС (Akaike information criterion)). Лучшая модель соответствовала его минимуму.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Для анализа влияния типа оптического излучения на декадную выживаемость при различных температурных режимах мы строили пробит-модель или логит-модель в зависимости от результатов АИС-критерия для каждой исследуемой группы. При этом мы получили коэффициенты наклона индивидуальной регрессии для каждой исследуемой группы (табл. 1), а также уравнения линейных пробит-моделей и значения полуметальных доз (LD50).

Таблица 1. Характеристики пробит (логит)-моделей декадной средней выживаемости эмбрионов и личинок радужной форели в зависимости от типа оптического излучения и температуры инкубации и выращивания

| Группы            | Коэффициент наклона | Уравнение линейной пробит (логит)-модели  | LD50  |
|-------------------|---------------------|-------------------------------------------|-------|
| Температура 12 °C |                     |                                           |       |
| Контроль          | 2,15                | $\text{probit}(P) = -7,8 + 2,15 \ln(D)$   | 38,83 |
| LED               | 2,83                | $\text{probit}(P) = -10,81 + 2,83 \ln(D)$ | 45,29 |
| LD                | 3,26                | $\text{probit}(P) = -12,40 + 3,26 \ln(D)$ | 44,48 |
| Температура 11 °C |                     |                                           |       |
| Контроль          | 2,37                | $\text{logit}(P) = -9,11 + 2,37 \ln(D)$   | 46,29 |
| LED               | 3,17                | $\text{logit}(P) = -12,41 + 3,17 \ln(D)$  | 49,91 |
| LD                | 4,77                | $\text{logit}(P) = -18,36 + 4,77 \ln(D)$  | 46,74 |
| Температура 10 °C |                     |                                           |       |
| Контроль          | 1,83                | $\text{logit}(P) = -7,01 + 1,83 \ln(D)$   | 45,41 |
| LED               | 3,82                | $\text{logit}(P) = -15,73 + 3,82 \ln(D)$  | 61,13 |
| LD                | 3,13                | $\text{logit}(P) = -13,02 + 3,13 \ln(D)$  | 64,24 |
| Температура 9 °C  |                     |                                           |       |
| Контроль          | 1,74                | $\text{logit}(P) = -7,35 + 1,74 \ln(D)$   | 67,15 |
| LED               | 5,64                | $\text{logit}(P) = -24,02 + 5,64 \ln(D)$  | 70,44 |
| LD                | 4,98                | $\text{logit}(P) = -21,56 + 4,98 \ln(D)$  | 75,68 |
| Температура 8 °C  |                     |                                           |       |
| Контроль          | 3,04                | $\text{logit}(P) = -12,17 + 3,04 \ln(D)$  | 54,16 |
| LED               | 5,11                | $\text{logit}(P) = -21,71 + 5,11 \ln(D)$  | 69,74 |
| LD                | 4,78                | $\text{logit}(P) = -20,14 + 4,78 \ln(D)$  | 67,16 |

Коэффициент наклона характеризует скорость развития эффекта при увеличении продолжительности голодания (отсутствия корма), а значение LD50 характеризует среднюю продолжительность голодания, при котором наблюдается гибель 50 % исследуемых эмбрионов и личинок радужной форели.

Для сравнения качества построенных моделей, использовали девианс-статистику, непосредственно вытекающая из оценок метода максимального правдоподобия (табл. 2).

Таблица 2. Девианс – анализ пробит (логит)-моделей декадной средней выживаемости эмбрионов и личинок радужной форели в зависимости от типа оптического излучения и температуры инкубации и выращивания

| № модели          | Остаток Df, | Остаток Девианс | Df | Девианс | p - критерий |
|-------------------|-------------|-----------------|----|---------|--------------|
| Температура 12 °C |             |                 |    |         |              |
| 1                 | 22          | 10,02           | –  | –       | –            |
| 2                 | 18          | 7,49            | 4  | 2,52    | 0,63         |
| Температура 11 °C |             |                 |    |         |              |
| 1                 | 22          | 24,92           | –  | –       | –            |
| 2                 | 18          | 19,25           | 4  | 5,66    | 0,22         |
| Температура 10 °C |             |                 |    |         |              |
| 1                 | 22          | 24,15           | –  | –       | –            |
| 2                 | 18          | 12,92           | 4  | 11,22   | 0,02         |
| Температура 9 °C  |             |                 |    |         |              |
| 1                 | 25          | 34,59           | –  | –       | –            |
| 2                 | 21          | 17,87           | 4  | 16,71   | 0,002        |
| Температура 8 °C  |             |                 |    |         |              |
| 1                 | 28          | 31,25           | –  | –       | –            |
| 2                 | 24          | 21,12           | 4  | 10,13   | 0,03         |

Статистическое сравнение на отличие от нуля разности девианса полученной пробит (логит)-модели (модель №2) от девианса нуль-модели без предикторов (модель №1) с использованием функции `anova()` в статистической среде R показывает (табл. 2), что включение фактора оптического излучения в аппроксимируемую зависимость доза-эффект не является статистически значимым в смысле уменьшения ошибки модели по критерию хи-квадрат для исследуемых групп при температуре 12 и 11 °C (p-значение равно 0,63 и 0,22 соответственно), и является статистически значимым с уровнем достоверности  $p < 0,05$  для исследуемых групп при температуре 10, 9 и 8 °C (p-значение равно 0,02; 0,002 и 0,03 соответственно).

При построении линии пробит (логит)-регрессии с учетом коэффициента наклона можно наблюдать имеющиеся различия в исследуемых группах (табл. 1). Так, при температуре 12 °C коэффициент наклона в контрольной группе составил 2,15, тогда как в опытных группах (LED, LD) он составил 2,83 и 3,26 соответственно, т. е. в исследуемых группах скорость нарастания эффекта была выше. Следует отметить, что значения LD50 в опытных группах были также выше, чем в контрольной группе. Однако, как показал девианс-анализ, установленные различия были недостоверными (табл. 2).

При температуре 11 °C коэффициент наклона в контрольной группе составил 2,37, тогда как в опытных группах (LED, LD) он составил 3,17 и 4,77 соответственно. Значения LD50 в опытных группах были также выше, чем в контрольной группе. Однако, как показал девианс анализ, установленные различия были недостоверными (табл. 2).

При температуре 10 °C коэффициент наклона в контрольной группе составил 1,83, тогда как в опытных группах (LED, LD) он составил 3,82 и 3,13 соответственно, т. е. в исследуемых группах скорость нарастания эффекта была выше. Значения LD50 в опытных группах были также выше, чем в контрольной группе. Как показал девианс-анализ, установленные различия были достоверными (табл. 2).

При температуре 9 °C коэффициент наклона в контрольной группе составил 1,74, тогда как в опытных группах (LED, LD) он составил 5,64 и 4,98 соответственно, т. е. в исследуемых группах скорость нарастания эффекта была значительно выше. Следует отметить, что значения LD50 в опытных группах были также выше, чем в контрольной группе. Как показал девианс анализ, установленные различия были достоверными (табл. 2).

При температуре 8 °C коэффициент наклона в контрольной группе составил 3,04, тогда как в опытных группах (LED, LD) он составил 5,11 и 4,78 соответственно, т. е. в исследуемых группах скорость нарастания эффекта была выше. Следует отметить, что значения LD50 в опытных группах были также выше, чем в контрольной группе. Как показал девианс анализ, установленные различия были достоверными (табл. 2).

Результаты анализа изменения величины стимулирующего эффекта оптического излучения на коэффициент угла наклона линии регрессии в зависимости от температуры инкубации и выращивания эмбрионов и личинок радужной форели представлены на рисунке.

При снижении температуры инкубации и выращивания эмбрионов и личинок радужной форели происходит увеличение стимулирующего эффекта оптического излучения на коэффициент угла наклона линии регрессии декадной выживаемости, достигая максимальных значений при температуре 9 °C, превышая контрольные значения на 224,13 % для LED излучения и на 186 %, для LD излучения.

По данным Голованова и Валтонена [12], динамика границ термоустойчивости эмбрионов и личинок радужной форели составляет 8–18 °C с оптимумом 6–12 °C, т. е. температурный диапазон, используемый в наших исследованиях (8–12 °C), находился в пределах оптимального, а наблюдаемый стимулирующий эффект не был результатом отклонения условий выращивания от нормы.

Как показали исследования Новикова [5], уменьшение температуры инкубации икры в пределах оптимальных значений, приводило к вылуплению личинок с большей белковой, а также липидной и углеводной массой тела. Это может объяснять полученные результаты наших исследований, т. к. один из механизмов действия оптического излучения на биологические системы заключается в ориентационном действии излучения, индуцирующем изменение пространственной структуры компонентов клетки, ответственных за регуляцию метаболических процессов.

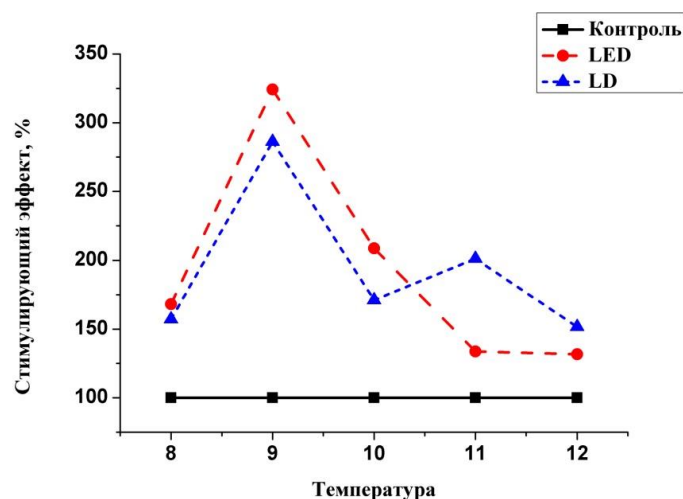


Рис. Изменение величины стимулирующего эффекта оптического излучения на коэффициент угла наклона линии регрессии декадной выживаемости эмбрионов и личинок радужной форели в зависимости от температуры инкубации и выращивания

Результаты наших исследований согласовываются с результатами Wen-hwa Kwain [13], в исследованиях которых наблюдаемая смертность эмбрионов и личинок радужной форели в температурном диапазоне 15–5 °С при воздействии кислой среды снижалась при понижении температуры, т. е. выживаемость эмбрионов и личинок под воздействием неблагоприятного фактора увеличивалась при понижении температуры.

**Вывод.** Таким образом, как показали проведенные исследования, температурный режим выращивания радужной форели, даже в пределах оптимальных значений, способен оказывать эффект на величину стимулирующего эффекта оптического излучения. Полученные результаты создают перспективы для более эффективного использования оптического излучения низкой интенсивности в технологии аквакультуры ценных видов рыб.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Барулин, Н. В. Системный подход к технологии регулирования воспроизводства объектов аквакультуры в рыбных индустриальных комплексах / Н. В. Барулин // Весці нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук – Минск. – 2015. – № 3. – С. 107–111.
2. Голованов, В. К. Изменчивость термоадаптационных свойств радужной форели *Oncorhynchus mykiss* Walbaum в онтогенезе / В. К. Голованов, Т. Валтонен // Биология внутренних вод. – 2000. – №2. – С. 106 – 115.
3. Инновационные методы и технологии устойчивого развития аквакультуры в регионе Балтийского моря: монография / Н. Барулин [и др.]. – Минск: Экоперспектива, 2016. – 414 с.
4. Портная, Т. В. Характер эмбрионального и постэмбрионального развития радужной форели при доинкубации икры в условиях неблагоприятного повышения температуры воды / Т. В. Портная, А. И. Портной, А. А. Сопот // Животноводство и ветеринарная медицина. – 2015. – № 2(17). – С. 26–33.
5. Рекомендации по выращиванию рыбопосадочного материала радужной форели в рыбных индустриальных комплексах (с временными нормативами): / Н. В. Барулин [и др.]. – Горки: БГСХА, 2016. – 179 с.
6. Новиков, Г. Г. Рост и энергетика развития костистых рыб в раннем онтогенезе / Г. Г. Новиков. – М.: Эдиториал УРСС, 2000 – 296 с.
7. Павлов, Д. А. Изменчивость морфологических показателей в раннем онтогенезе лососей рода *Salmo* под действием температуры и солености / Д. С. Павлов // Проблемы раннего онтогенеза рыб Калининград, 1983. – С. 59–60.
8. Плавский, В. Ю. Влияние низкоинтенсивного лазерного облучения икры на жизнестойкость молоди осетровых рыб / В. Ю. Плавский, Н. В. Барулин // Журнал прикладной спектроскопии. – 2008 – Т. 75, 2 – С. 233–241.
9. Барулин, Н. В. Жаброногий рачок *Artemia salina* L. как объект для исследования биологической активности оптического излучения низкой интенсивности / Н. В. Барулин, В. Ю. Плавский, В. А. Орлович // Вопросы рыбного хозяйства Беларуси. – Минск. – 2012. – № 28. – С. 42–49.
10. R Core Team, 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
11. Fox J. 2005. The R Commander: A Basic Statistics Graphical User Interface to R. // J. of Statistical Software. V. 14(9). P. 1–42.
12. Pohlert T. 2014. The Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package (PMCMR). R package, URL: <http://CRAN.R-project.org/package=PMCMR>.
13. Wen-hwa, K. Effects of Temperature on Development and Survival of Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*, in Acid Waters / K. Wen-hwa // Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 1975, 32(4): 493–497.