*УДК 574.626*

# ПРОБЛЕМЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВЕТВИСТОУСЫХ РАКООБРАЗНЫХ (CLADOCERA) КАК СТАРТОВОГО ЖИВОГО КОРМА И СТРАТЕГИЯ ИХ ПРЕОДОЛЕНИЯ

**Вл. К. Чугунов**

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН*

*152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, e-mail: vlad.tchougounov@gmail.com*

Современная аквакультура нуждается в разноплановых инструментах интенсификации. Живой корм значительно повышает жизнестойкость молоди рыб и ракообразных. Самым перспективным кормом для молоди многих видов рыб являются кладоцеры рода *Moina* Baird (Cladocera: Moinidae). Проанализирована и обобщена информация по проблемам культивирования моин и перспективам их решения. Для получения стабильной высокопродуктивной культуры моин необходимо учитывать голодовую химическую коммуникацию и не допускать голодания особей популяции.

*Ключевые слова: Moina*, аквакультура, живой стартовый корм.

DOI: 10.24411/0320-3557-2019-10021

Интенсификация аквакультуры как товарной, так и направленной на воспроизводство водных биоресурсов (рыб, ракообразных, моллюсков, иглокожих и пр.), требует разработки технологий, повышающих скорость роста и снижающих смертность молоди культивируемых объектов. Критически важный для этого момент – переход личинок на смешанное и внешнее питание. Стартовая пища должна обеспечивать все физиологические потребности растущего организма, быть доступной по размерам и привлекательной по поведенческим особенностям.

Все виды культивируемых рыб и десятиногих ракообразных проходят стадию питания зоопланктоном. Естественным кормом личинок и молоди рыб и беспозвоночных служат зоопланктон и нектобентос нерестовых водоёмов и водотоков. Кладоцеры родов *Daphnia* O.F. Mueller (Daphniidae) и *Moina* Baird (Moinidae) в середине – конце прошлого века считались перспективным стартовым живым кормом, но в современных методиках ведения аквакультуры для большинства видов рыб и креветок ветвистоусые были вытеснены другими кормами, получаемыми технологичными, индустриальными методами: использованием декапсулированных яиц или пророщенных науплиусов *Artemia* и/или специальными стартовыми комбикормами с частично ферментированными компонентами.

Одной из причин снижения интереса предприятий аквакультуры к выращиванию ветвистоусых рачков было отсутствие чётко управляемой и хорошо прогнозируемой (стабильной) высокопродуктивной технологии получения кормовой биомассы.

**Современное состояние культивирования кладоцер.** Моины и дафнии условно успешно культивируются двумя способами: в высокотрофных прудах и в специальных культиваторах. Первый способ [Lavens, Sorgeloos, 1996] применим и в тропических и в умеренных регионах сезонно. Из-за связи с погодными явлениями прудовые культуры рачков с высокими продукционными характеристиками не могут надёжно управляться, а нестабильные гидробиологические процессы в микробиальной петле удобряемых органикой прудов неизбежно приводят к дефициту пищи кладоцер на пике численности, а затем – к развитию придонной гипоксии и гибели популяции. Открытые высокотрофные экосистемы с, по определению, незанятыми трофическими нишами очень быстро заселяются другими видами гидробионтов. Многие из них, в конечном счёте, не снижают продукцию кладоцер, другие (даже не образуя большой биомассы) могут за короткое время уничтожить всех рачков контактно, например, гидры и плоские черви. Другие гидробионты нарушают жизнедеятельность (питание, дыхание, локомоцию) рачков – таковы эпибионтные виды-оппортунисты, инфузории и коловратки. Никаких перспектив получения робастной прудовой аквакультуры кладоцер не существует.

Гидробиологический подход к культивированию кладоцер в контролируемых условиях показал свою несостоятельность [Кокова, 1982 (Kokova, 1982), Lavens, Sorgeloos, 1996]. Недостаточная изученность эколого-эволюционных адаптаций у представителей рода *Moina* была причиной нестабильной продукции биомассы рачков при попытках их разведения. Наивное представление о плотностно-зависимой популяционной динамике моин, описанной ещё Августом Вейсманом, было уточнено. В частности, выявлен сигнал “Го-

лод!", т.е. внутрипопуляционная голодовая химическая коммуникация [Tchougounov, 2009].

К культиваторам в цехах живых кормов предприятий аквакультуры полного цикла в прошлом веке предъявлялись сложно реализуемые в то время требования. Стремительно дешевеющая современная энергоэффективная светодиодная и микроконтроллерная техника позволяют автоматизировать управление сложными популяционными процессами в фито- и зообиореакторах.

**Перспективы культивирования моин и других кладоцер.** Высокопродуктивное культивирование любых живых организмов сталкивается не только с техническими трудностями, но и с результатами эволюционно стабильных стратегий самих организмов. Ветвистоусые рачки эволюционировали в сторону увеличения разнообразия физиологических реакций на различные внешние факторы [Colbourne et al., 2011]. Следует принять во внимание как минимум четыре эволюционно стабильных механизма ограничения популяционного роста рачков.

1) Чем выше скорость роста популяции, тем сильнее должны быть внутрипопуляционные механизмы ограничения роста численности. Главным регулятором роста популяции является трофический фактор (параметр K из логистического уравнения Ферхюльста, ёмкость среды), поэтому современные моиниды, обладающие максимальной скоростью роста популяции, используют голодовую химическую коммуникацию, ограничивающую рост популяции до исчерпания пищи. Если хотя бы часть особей негомогенной популяции испытала нехватку пищи, выделяемые ими феромоны распространяют информацию о надвигающемся голодании, что включает три последующих регулирующих рост популяции процесса с разными характерными временами.

2) Изменение трофической обеспеченности самок вызывает неспецифическую реакцию снижения метаболизма, уменьшения скорости фильтрации пищи [Tchougounov, 2009] и снижения плодовитости популяции в целом.

3) Следующая по времени реакция – индукции фенотипа самцов в будущем потомстве [Olmstead, Leblanc, 2002]. В размножающейся партеногенезом популяции культиватора самцы – ненужное обременение: пищу потребляют, но биомассу увеличивают незначительно.

По-видимому, два этих механизма (2 и 3) имеют сходную эндокринную основу – увеличение титра ювенильного гормона [Riddiford, 1994, Mirth et al., 2005, 2014, Fernandez-Nicolas, Belles, 2017].

4) Ювенильные моины и дафнии любого возраста могут приступить к производству латентных яиц, вместо субитанных, что радикально снижает скорость роста популяции и увеличивает смертность. Этот эндокринный процесс до сих пор совершенно не раскрыт, т.к. ему нет аналога у других (в т.ч. шестиногих) ракообразных, которые гораздо более изучены, чем кладоцеры. Можно предположить, что в индукции гамогенеза ключевую роль играют пептидные гормоны.

Проблемы культивирования кладоцер и пути их решения также можно разделить на четыре группы.

1) **Эффективность культивирования**, которая зависит от оптимальности подбора объекта. Необходимо использовать селекционные и генетически трансформированные культуры, в которых нарушены перечисленные выше механизмы самоограничения популяций. Длительной селекцией нами был получен клон *Moina macrocopa*, который утерял способность образовывать латентные яйца. По неопубликованным данным автора продукция биомассы этого клона была в 3–4 раза выше, чем у диких клонов, способных к половому размножению.

Ветвистоусые ракообразные удобны и потенциально весьма перспективны для генетических трансформаций не только в фундаментальном [Nakanishi et al., 2016, Kumagai et al., 2017, Hiruta et al., 2018], но и в аквакультурном аспекте. Следует разделять гены, участвующие в эндокринном этапе регуляции и во внутриклеточных сигнальных путях. Первоочередными целями генетических трансформаций (нокаут, дупликация) следуют считать эволюционно более лабильные гены белков синтеза и рецепции ювенильного гормона для ослабления его влияния, а также инсулиноподобного фактор роста – для усиления.

Гены различных сигнальных каскадов более консервативны, т.к. их роли в различных тканях организма различаются, и мутации в них могут быть летальными. В прошлом веке многие пестициды были нацелены на нарушение гормональной оси ювенильного гормона (ювениоды). Как и в случае других пестицидов у насекомых-вредителей быстро эволюционировала устойчивость к ювеноидам [Hammock et al., 1977, Charles et al., 2011, Miyakawa et al., 2013].

По неопубликованным данным автора клональные культуры *M. macrocopa* из одной популяции могут продуцировать различное количество самцов, но не обнаружено ни одно-

го не продуцирующего самцов клона, т.к. подобная мутация значительно снижает приспособленность у обитателей временных водоёмов. У *D. magna* [Molinier et al., 2019] и *D. pulex* [Ye et al., 2019] бессамцовые генотипы реализованы различными путями. Мутантные гены устойчивости к ювеноидам и бессамцовости дафний можно использовать за образцы для направленного мутагенеза.

2) **Физиологические проблемы** особей, которые устраняются тщательным подбором абиотических и биотических параметров культивирования. Автором были разработаны два многокомпонентных препарата, которые 1) стабилизируют и 2) ускоряют рост численности популяции ветвистоусых (до 30%) и других ракообразных [Чугунов, 2019 (Tchougounov, 2019)].

3) **Поведенческие особенности** кладоцер должны контролироваться программно-аппаратным комплексом, который снижает трудоёмкость получения стабильного урожая биомассы культиватора.

4) Внутрипопуляционная коммуникация моин подсказывает **различия режимов культивирования** и сбора урожая: плотность популяции моин должна задаваться постоянным уровнем пищи *ad libitum*, но ограничиваться регулярным сбором урожая до наступления голодания.

Большинство животных и растений, массово выращиваемых в современном сельском хозяйстве, прошло через тысячи лет искусственного отбора по некоторым продукционным и потребительским характеристикам. Представители рода *Moina*, осваивая временные континентальные водоёмы, сотни миллионов лет подвергались естественному отбору и на высокую скорость размножения и на адаптации, ограничивающие плотность популяции (эволюционный trade-off). Современные генетические технологии, позволяющие отключать ненужные в культуре физиологические функции, наряду с методами выращивания, адекватно учитывающими другие эколого-эволюционные адаптации, позволят кратно увеличить продуктивность ветвистоусых рачков как живого стартового корма и как метод переработки отходов некоторых пищевых производств в источник ценного белка, компонента комбикормов.

Выражаю благодарность сотням коллег, которые в жесточайших экспедиционных условиях отважно рискуют здоровьем и жизнью для сбора проб грунта временных водоёмов с латентными яйцами бранхиопод и доставляют в нашу лабораторию. Работа выполнена в рамках государственного задания (АААА-А18-118012690101-2).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Кокова В.Е. Непрерывное культивирование беспозвоночных. Наука. Сиб. отд-ние, 1982. 168 с.

Чугунов Вл.К. Состав и способ использования двух комбинированных препаратов, направленных на стабилизацию и ускорение динамики численности кладоцер и других ракообразных. Ноу-хау. ИБВВ РАН. Приказ № 27. 11.02.2019.

Charles J.P., Iwema T., Epa V.C., Takaki K., Rynes J., Jindra M. Ligand-binding properties of a juvenile hormone receptor, Methoprene-tolerant //Proceedings of the National Academy of Sciences. 2011. Vol. 108. № 52. P. 21128–21133. DOI: 10.1073/pnas.1116123109

Colbourne J.K., Pfrender M.E., Gilbert D., Thomas W.K., Tucker A., Oakley T.H., ... , Bauer D.J. The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex* // Science. 2011. Vol. 331. № 6017. P. 555–561. DOI: 10.1126/science.1197761

Fernandez-Nicolas A., Belles X. Juvenile hormone signaling in short germ-band hemimetabolan embryos //Development. 2017. Vol. 144. № 24. P. 4637–4644. DOI: 10.1242/dev.152827

Hammock B.D., Mumby S.M., Lee P.W. Mechanisms of resistance to the juvenoid methoprene in the house fly *Musca domestica* L //Pesticide Biochemistry and Physiology. 1977. Vol. 7. № 3. P. 261–272. DOI: 10.1016/0048-3575(77)90017-7

Hiruta C., Kakui K., Tollefsen K.E., Iguchi T. Targeted gene disruption by use of CRISPR / Cas9 ribonucleoprotein complexes in the water flea *Daphnia pulex* //Genes to cells. 2018. Vol. 23. № 6. P. 494–502. DOI: 10.1111/gtc.12589

Kumagai H., Nakanishi T., Matsuura T., Kato Y., Watanabe H. CRISPR / Cas-mediated knock-in via non-homologous end-joining in the crustacean *Daphnia magna* //PloS one. 2017. Vol. 12. № 10. P. e0186112. DOI: 10.1371/journal.pone.0186112

Lavens P., Sorgeloos P. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper. FAO, Rome, 1996. № 361. 295 p.

Mirth C., Truman J.W., Riddiford L.M. The role of the prothoracic gland in determining critical weight for metamorphosis in *Drosophila melanogaster* //Current Biology. 2005. Vol. 15. № 20. P. 1796–1807. DOI: 10.1016/j.cub.2005.09.017

Mirth C.K. Tang H.Y., Makohon-Moore S.C., Salhadar S., Gokhale R.H., Warner R.D., Koyama T., Riddiford L.M., Shingleton A.W. Juvenile hormone regulates body size and perturbs insulin signaling in *Drosophila* //Proceedings of the National Academy of Sciences. 2014. Vol. 111. № 19. P. 7018–7023. DOI: 10.1073/pnas.1313058111

Miyakawa H., Toyota K., Hirakawa I., Ogino Y., Miyagawa S., Oda S., ... Iguchi T. A mutation in the receptor Methoprene-tolerant alters juvenile hormone response in insects and crustaceans //Nature communications. 2013. Vol. 4. P. 1856. DOI: 10.1038/ncomms2868

Molinier C., Reisser C.M., Fields P.D., Ségard A., Galimov Y., Haag C.R. Evolution of gene expression during a transition from environmental to genetic sex determination //Molecular biology and evolution. 2019. Vol. 36. № 7. P. 1551–1564. DOI: 10.1093/molbev/msz123

Nakanishi T., Kato Y., Matsuura T., Watanabe H. TALEN-mediated knock-in via non-homologous end joining in the crustacean *Daphnia magna* //Scientific reports. 2016. Vol. 6. P. 36252. DOI: 10.1038/srep36252

Olmstead A.W., Leblanc G.A. Juvenoid hormone methyl farnesoate is a sex determinant in the crustacean *Daphnia magna* //Journal of Experimental Zoology. 2002. Vol. 293. № 7. P. 736–739. DOI:10.1002/jez.10162

Riddiford L.M. Cellular and molecular actions of juvenile hormone I. General considerations and premetamorphic actions //Advances in insect physiology. 1994. Vol. 24. P. 213–274. DOI: 10.1016/S0065-2806(08)60084-3

Tchougounov Vl.K. A pheromone-induced developmental switch in *Moina macrocop*a (Cladocera, Moinidae): The “Hunger!” signal forms the dauer stage //Doklady Biological Sciences. 2009. Vol. 425. № 1. P. 125–127. DOI: 10.1134/S0012496609020112

Ye Z., Molinier C., Zhao C., Haag C.R., Lynch M. Genetic control of male production in *Daphnia pulex* // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2019. Vol. 116. № 31. P. 15602–15609. DOI: 10.1073/pnas.1903553116

REFERENCES

Charles J.P., Iwema T., Epa V.C., Takaki K., Rynes J., Jindra M. 2011. Ligand-binding properties of a juvenile hormone receptor, Methoprene-tolerant // Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 108. № 52. P. 21128–21133. DOI: 10.1073/pnas.1116123109

Colbourne J.K., Pfrender M.E., Gilbert D., Thomas W.K., Tucker A., Oakley T.H., ... , Bauer D.J. 2011. The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex* // Science. Vol. 331. № 6017. P. 555–561. DOI: 10.1126/science.1197761

Fernandez-Nicolas A., Belles X. 2017. Juvenile hormone signaling in short germ-band hemimetabolan embryos // Development. Vol. 144. № 24. P. 4637–4644. DOI: 10.1242/dev.152827

Hammock B.D., Mumby S.M., Lee P.W. 1977. Mechanisms of resistance to the juvenoidmethoprene in the house fly *Musca domestica* L // Pesticide Biochemistry and Physiology. Vol. 7. № 3. P. 261–272. DOI: 10.1016/0048-3575(77)90017-7

Hiruta C., Kakui K., Tollefsen K.E., Iguchi T. 2018. Targeted gene disruption by use of CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes in the water flea *Daphnia pulex* // Genes to cells. Vol. 23. № 6. P. 494–502. DOI: 10.1111/gtc.12589

KokovaV.E. 1982. Nepreryvnoe kul'tivirovanie bespozvonochnyh. Nauka. Sib. otd-nie. 168 c. [In Russian]

Kumagai H., Nakanishi T., Matsuura T., Kato Y., Watanabe H. 2017. CRISPR/Cas-mediated knock-in via non-homologous end-joining in the crustacean *Daphnia magna* // PloS one. Vol. 12. № 10. P. e0186112. DOI: 10.1371/journal.pone.0186112

Lavens P., Sorgeloos P. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper. № 361. FAO, Rome. 295 p.

Mirth C., Truman J.W., Riddiford L.M. 2005. The role of the prothoracic gland in determining critical weight for metamorphosis in *Drosophila melanogaster* // Current Biology. Vol. 15. № 20. P. 1796–1807. DOI: 10.1016/j.cub.2005.09.017

Mirth C.K. Tang H.Y., Makohon-Moore S.C., Salhadar S., Gokhale R.H., Warner R.D., Koyama T., Riddiford L.M., Shingleton A.W. 2014. Juvenile hormone regulates body size and perturbs insulin signaling in *Drosophila* // Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 111. № 19. P. 7018–7023. DOI: 10.1073/pnas.1313058111

Miyakawa H., Toyota K., Hirakawa I., Ogino Y., Miyagawa S., Oda S., ... Iguchi T. 2013. A mutation in the receptor Methoprene-tolerant alters juvenile hormone response in insects and crustaceans // Nature communications. Vol. 4. P. 1856. DOI: 10.1038/ncomms2868

Molinier C., Reisser C.M., Fields P.D., Ségard A., Galimov Y., Haag C.R. 2019. Evolution of gene expression during a transition from environmental to genetic sex determination // Molecular biology and evolution. Vol. 36. № 7. P. 1551–1564. DOI: 10.1093/molbev/msz123

Nakanishi T., Kato Y., Matsuura T., Watanabe H. 2016. TALEN-mediated knock-in via non-homologous end joining in the crustacean *Daphnia magna* // Scientific reports. Vol. 6. P. 36252. DOI: 10.1038/srep36252

Olmstead A.W., Leblanc G.A. 2002. Juvenoid hormone methyl farnesoate is a sex determinant in the crustacean *Daphnia magna* //Journal of Experimental Zoology. Vol. 293. № 7. P. 736–739. DOI:10.1002/jez.10162

Riddiford L.M. 1994. Cellular and molecular actions of juvenile hormone I. General considerations and premetamorphic actions //Advances in insect physiology. Vol. 24. P. 213–274. DOI: 10.1016/S0065-2806(08)60084-3

Tchougounov Vl.K. 2009. A pheromone-induced developmental switch in *Moina macrocop*a (Cladocera, Moinidae): The “Hunger!” signal forms the dauer stage //Doklady Biological Sciences. Vol. 425. № 1. P. 125–127. DOI: 10.1134/S0012496609020112

Tchougounov Vl.K. Sostav i sposob ispol'zovaniya dvuh kombinirovannyh preparatov, napravlennyh na stabilizaciyu i uskorenie dinamiki chislennosti kladocer i drugih rakoobraznyh. Nou-hau. IBVV RAN. Prikaz № 27. 11.02.2019 [In Russian]

Ye Z., Molinier C., Zhao C., Haag C.R., Lynch M. 2019. Genetic control of male production in *Daphnia pulex* // Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 116. № 31. P. 15602–15609. DOI: 10.1073/pnas.1903553116

# CLADOCERA CULTIVATION FUNDAMENTALS AS A LIVE FOOD FOR MODERN AQUACULTURE

**Vl. K. Tchougounov**

*Papanin Institute for Biology of Inland Waters of Russian Academy of Sciences*
*Borok, Nekouzski raion, Yaroslavl oblast, 152742 Russia, e-mail: vlad.tchougounov@gmail.com*

Modern aquaculture requires a live food for juvenile fish and crustaceans. Different species of g. *Moina* are the most promising replacement for *Artemia* nauplii. The best way for robust *Moina* biomass production is cultivation under strictly controlled conditions in special tanks with a constant feed level and stable replenishment.

*Keywords*: *Moina*, aquaculture, live food