

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОЗРАСТА АЗОВСКОЙ ХАМСЫ *ENGRAULIS ENCRASICOLUS MAEOTICUS* (ENGRAULIDAE) НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ИЗОБРАЖЕНИЙ ОТОЛИТОВ

© 2023 г. М. В. Чесалин*

Институт биологии южных морей РАН – ИнБИОМ РАН, Севастополь, Россия

*E-mail: chesalin.mikhail@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.06.2022 г.

После доработки 06.07.2022 г.

Принята к публикации 11.07.2022 г.

Для уточнения определения возраста азовской хамсы *Engraulis encrasicolus maeoticus* оценены размеры отолитов сеголеток и радиусы годовых колец в отолитах особей разных возрастных групп. Проанализированы отолиты 380 рыб, отловленных в Азовском море в октябре–ноябре 2018 г. и у северо-западного побережья Кавказа в феврале 2019 г. С применением программы ImageJ измерена наибольшая длина отолита и построены профили интенсивности отражённого света вдоль трансекты по длине отолита. У сеголеток средней абсолютной длиной 70.9 ± 6.7 мм в октябре–ноябре радиус отолитов в среднем составил 0.95 ± 0.08 мм, а в феврале при средней длине рыб 66.6 ± 10.6 мм – 0.86 ± 0.15 мм. У самых мелких сеголеток длиной 48–55 мм расстояние от центра отолита до конца светлой опаковой зоны варьировало от 0.54 до 0.72 (в среднем 0.63 ± 0.04) мм. Радиусы до центра тёмной гиалиновой зоны отолитов для разных возрастных групп хамсы по осреднённым данным составили: $R_1 - 0.94 \pm 0.09$, $R_2 - 1.23 \pm 0.08$ и $R_3 - 1.40 \pm 0.07$ мм. Настоящее исследование направлено на развитие автоматических методов определения возраста рыб по пикам профилей на изображениях отолитов.

Ключевые слова: азовская хамса *Engraulis encrasicolus maeoticus*, отолит, обработка цифровых изображений, возраст, радиус годового кольца.

DOI: 10.31857/S0042875223030050, **EDN:** BYBDBK

Определение возраста и роста рыб необходимо при изучении динамики численности, составлении прогнозов будущих уловов, промысловой разведке рыб, их выращивании в естественных водоёмах и водохранилищах, акклиматизации, изучении внутривидовой структуры популяций и оценке рыбопродуктивности водоёмов (Чугунова, 1959). Данные о возрасте рыб нужны для понимания жизненно важных особенностей видов и популяций (продолжительность жизни, возраст пополнения и наступления половозрелости, длительность репродуктивного периода, смертность, возрастная структура), которые используют при оценке запасов (Panfili et al., 2002; Moore et al., 2019).

Изучением возраста рыб занимаются в специализированных лабораториях во многих европейских странах. С 1990-х годов начались обмены отолитами и семинары для перекрёстной проверки определения возраста европейского анчоуса *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758) из разных районов Восточной Атлантики (Astudillo et al., 1990; Villamor, Uriarte, 1996; Uriarte, 2002; Uriarte et al., 2007). В 2008–2009, 2014–2016 и 2020 гг. были проведены рабочие совещания по методам чтения

отолитов рыб из Атлантики и Средиземного моря (ICES, 2010, 2017, 2020), в результате которых был разработан международный протокол и согласованы критерии визуального определения возраста этого вида из атлантических и средиземноморских районов (ICES, 2017). Рекомендации по определению возраста основных промысловых и других видов рыб в европейских морях обобщены в руководствах (Carbonara, Follesa, 2019; Vitale et al., 2019). В 2019 г. в Турции по проблеме определения возраста черноморского анчоуса, называемого в Азово-Черноморском регионе хамсой, был проведён первый международный семинар, на котором согласован протокол визуального определения возраста черноморской и азовской хамсы по годовым кольцам на отолитах (Akkus et al., 2019).

До настоящего времени методика определения возраста рыб по отолитам и другим регистрирующим структурам (чешуе, костям) в большинстве случаев основана на визуальном исследовании под бинокулярным микроскопом и зависит от субъективной интерпретации специалиста-оператора. В частности, у семи экспертов из разных стран (Турция, Грузия, Украина и Румыния) отмечен низкий

уровень согласия (54%) в определении возраста 60 пар отолитов черноморской хамсы, отловленной у побережья Турции в разные месяцы (Akkus, 2019), и это привело к необходимости стандартизации процедуры определения возраста и разработки единого протокола для повышения точности и достоверности получаемых данных, которые используются при оценке запасов этого вида.

Ещё в 1960-х годах Мина (1965, 1967) на примере отолитов трески предложил так называемый фотометрический способ, основанный на фотографировании шлифа отолита под микроскопом и последующего помещения негатива в микрофотометр, в котором свет, проходя через негатив, попадает на фотоэлемент и возбуждает фототок. Далее ток поступает на гальванометр и на фотобумаге или пластине вычерчивается волнообразная кривая, по которой можно судить об изменениях оптической плотности негатива отолита на разных участках от центра к периферии. Поднятия этой кривой соответствуют более светлым opakовым зонам отолита, провалы же — более тёмным гиалиновым зонам (Мина, 1965). В дальнейшем методику анализа цифровых изображений, профилей яркости и спектрального анализа отолитов и чешуи промысловых рыб, а также других морских объектов развивал Васильков (Васильков, Левада, 1977; Васильков, 1979, 2006, 2007, 2009).

Зарубежные исследователи многократно пытались использовать компьютерную технику для определения возраста рыб (Fawel, 1974; Frie, 1982; Campana, 1987; McGowan et al., 1987; Messieh et al., 1989; Panfili et al., 1990; Fablet, 2006). Первые системы автоматического или полуавтоматического определения возраста рыб по отолитам были основаны на анализе одномерной (1D) плотности распределения света вдоль луча (трансекты), направленной от центра (ядра) к краю отолита (Panfili et al., 1990; Troadec, 1991; Masy, 1995; Welleman, Storbeck, 1995; Cailliet et al., 1996; Robertson, Morrison, 1999; Takashima et al., 2000). Позднее эти системы продвинулись в направлении использования двухмерных (2D) моделей, когда исследователи трансформировали выбранный сегмент или целый отолит в прямоугольную систему координат, а затем уже анализировали профили интенсивности проходящего света с помощью дескрипторов Фурье или вейвлет-анализа (Troadec et al., 2000; Palmer et al., 2005; Formella et al., 2007; Fablet et al., 2008). Недавно были применены рентгеновские технологии сканирования с помощью компьютерного томографа для создания изображений срезов регистрирующих структур промысловых рыб, которые можно реконструировать в виртуальные трёхмерные (3D) изображения, вращая их и просматривая в любой плоскости (Metscher, 2009; Geraghty et al., 2012; Parsons et al., 2018; Moore et al., 2019).

В 2007–2009 гг. под эгидой Европейской комиссии с целью автоматизации процесса определения возраста рыб (трески *Gadus morhua*, морской камбалы *Pleuronectes platessa* и европейского анчоуса) по изображениям отолитов был выполнен проект AFISA (Automated FISH Ageing), результаты которого детально представлены в заключительном отчёте (Mahé, 2009). При этом была разработана специальная программа TNPC (Traitement Numérique des Pièces Calcifiées — Numerical Treatment of Calcified Structures) для автоматического определения возраста по отолитам и чешуе рыб (Mahé et al., 2011). Наиболее полный обзор работ по компьютерным методам определения возраста рыб приведён в статье Фишера и Хантера (Fisher, Hunter, 2018). В процессе изучения формы отолитов и определения возраста рыб стали использовать различные программы анализа изображений, в основном разработанные для микроскопической техники, в том числе ImageJ (Abramoff et al., 2004) и ImagePro (Whitman, Johnson, 2016) со специальным модулем ObjectJ, в котором прописана методика автоматического подсчёта годовых колец на отолитах рыб и расчёта межгодовых приростов (Denéchaud et al., 2018). В последние годы для повышения качества и стандартизации процесса определения возраста рыб, а также анализа формы отолитов появились специализированные компьютерные программы, такие как SmartDots (ICES, 2019) и OTOLaB (Nava et al., 2018).

В настоящем исследовании для определения возраста азовской хамсы *E. encrasicolus maeoticus* Pusanov, 1926 использовали программу анализа изображений ImageJ, подобно тому, как это сделано для отолитов северной путассу *Micromesistius poutassou* (Gonçalves et al., 2017). Следует отметить, что в недавней публикации по систематике анчоусов рода *Engraulis* было предложено выделить прибрежных анчоусов, в том числе азовских, в отдельный вид *Engraulis maeoticus* Pusanov et Zeeb, 1926 (Bonhomme et al., 2021).

Основная цель работы — определить радиусы годовых зон в отолитах азовской хамсы, чтобы уточнить правильность определения возраста рыб. Азовская хамса составляет около половины российского промышленного вылова рыб в Азово-Черноморском бассейне (Шляхов и др., 2018), но опубликованные данные по её возрасту и росту единичны (Попова, 1954; Деметьева, 1958; Корнилова, 1960; Воловик, Козлитина, 1983; Chesalin et al., 2020), а сведения о размерах годовых колец в отолитах отсутствуют.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом служили пробы азовской хамсы из уловов донных ловушек в южной части Азовского моря в октябре–ноябре 2018 г. и траловых уловов в Чёрном море в месте зимовки рыб в рай-

оне г. Анапа в феврале 2019 г. Всего были исследованы отолиты 380 рыб, в том числе 111 экз. возрастной группы 0+ (сеголетки и зимующие сеголетки), 130 – 1+ (двухлетки и зимующие двухлетки), 91 – 2+ (трёхлетки и зимующие трёхлетки) и 48 – 3+ (четырёхлетки и зимующие четырёхлетки).

Наиболее крупные правый и левый отолиты (сагитты) извлекали из головы рыбы, тщательно промывали водой и очищали, а затем хранили сухими в микропробирках типа Эппендорф с соответствующей нумерацией. Для исследования возраста рыб отолиты помещали по одному слуховой бороздкой вниз в раствор глицерина (70% глицерина, 20% этанола и 10% воды), просматривали целиком в отражённом свете на чёрном фоне под стереомикроскопом Olympus SZX16 (“Olympus Corp.”, Япония) и фотографировали с применением цифровой камеры Olympus UC-50 и программного обеспечения Olympus Stream при увеличении $\times 25$. Для получения однородного освещения отолита использовали боковые осветители. Возраст рыб определяли визуально по количеству тёмных зимних гиалиновых колец в отражённом свете, если они были хорошо выражены на роструме, антироструме и построструме отолита, как это рекомендуется в протоколе определения возраста азовской и черноморской хамсы (Akkus et al., 2019). Если тёмное кольцо внутри отолита было узким и не просматривалось вокруг отолита или, по крайней мере, в двух вышеуказанных частях, то его считали ложным (дополнительным кольцом).

Измерения изображений отолитов проводили с использованием программы ImageJ (Abràmoff et al., 2004), имеющейся в свободном доступе (<https://imagej.net>). Сначала устанавливали шкалу (Set Scale) и калибровали изображение. Далее измеряли наибольшую длину отолита (OL) от конца рострума до конца построструма и вдоль этой линии строили график профиля (Analyze → Plot Profile). Этот график представляет собой двумерное изображение интенсивности распределения пикселей вдоль выбранной линии в оттенках серого или плотности распределения отражённого света и характеризует тёмные и светлые зоны отолита. Иногда линию трансекты немного смещали вправо или влево, чтобы она прошла через более характерные зоны, поэтому строили несколько профилей, затем их сравнивали и выбирали наиболее показательный график для анализа. Программа ImageJ создаёт высокочастотный профиль, поэтому на графиках наблюдается множество мелких пиков, которые предварительно сглаживали, применяя к изображению отолита фильтр (Process → Filters → Gaussian Blur Sigma 3). График профиля каждого отолита сохраняли в формате JPEG, а цифровые данные — в таблице Excel с соответствующей нумерацией отолита. При этом шкала абсцисс показывала длину с шагом измерений 1.72 мкм, а шкала ординат — интенсивность в пикселях.

Для определения радиусов годовых зон проводили линию из центра (ядра, примордиума) отолита к широкому заднему краю построструма, как это рекомендовано в протоколе ИКЕС (ICES, 2017). Далее строили профиль интенсивности отражённого света и на графике находили снижения, соответствующие той или иной тёмной гиалиновой зоне, а в таблице Excel отмечали расстояние до минимального значения на графике, которое принимали за радиус годового кольца. Затем эти расстояния усредняли, кроме того, по ним были построены графики частотного распределения радиусов годовых колец для разных возрастных групп.

Для оценки возраста рыбы по графикам профиля отолита необходимо учитывать некоторые технические особенности, связанные со структурой отолита. Оtolиты рыб имеют изогнутую наружную поверхность и внутреннюю кристаллическую структуру, поэтому на снимках могут появляться блики, которых нужно избегать. Для большинства отолитов к их краю характерно резкое понижение интенсивности отражённого света, не связанное с тёмной гиалиновой зоной. В то же время на самом краю отолита зачастую происходит преломление света (блик), которое приводит к резкому подъёму кривой на графике, но не является проявлением светлой опаковой зоны. Поэтому край отолита не учитывают как годовое кольцо.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Общая длина тела (TL) азовской хамсы варьировала от 48 до 139 мм, масса — от 0.45 до 13.30 г (таблица). Более крупные рыбы были отловлены в октябре—ноябре 2018 г. по сравнению с февралём 2019 г., однако для соответствующих возрастных групп различия в длине тела были не очень значительны.

Размеры отолитов увеличиваются с размерами рыб, причём этот процесс замедляется у особей длиной > 110 мм (рис. 1). В целом зависимость длины отолита от общей длины тела азовской хамсы можно описать линейным уравнением: $OL = 0.02586 TL$, $R^2 = 0.93$.

Типичные отолиты особей разных возрастных групп азовской хамсы представлены на рис. 2. Опаковая зона формируется в летний сезон, в период активного откорма и роста этих летненерестующих рыб. В отражённом свете опаковая зона матово-белого цвета, а гиалиновая зона тёмная. Ядро отолита в большинстве случаев слабо выражено или представлено тёмным кольцом, которое в некоторых случаях может быть довольно широким. По тонкому краю отолита обычно просматривается узкая тёмная зона, которая не является зимним гиалиновым кольцом.

Длина сеголеток (возрастная группа 0+) из Азовского моря в октябре—ноябре 2018 г. составляла 55—

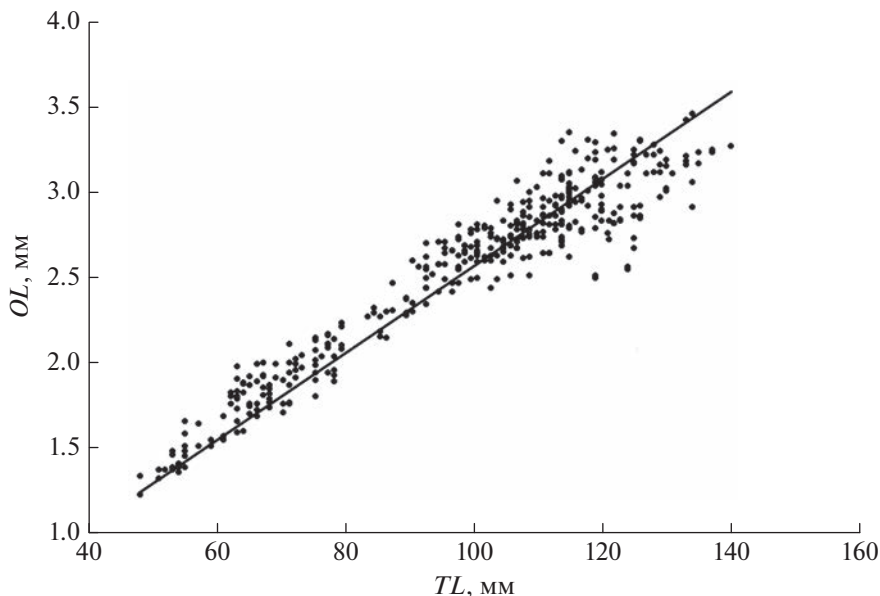


Рис. 1. Связь длины отолита (*OL*) с общей длиной тела (*TL*) азовской хамсы *Engraulis encrasicolus maeoticus*. $OL = 0.02586TL$, $R^2 = 0.93$.

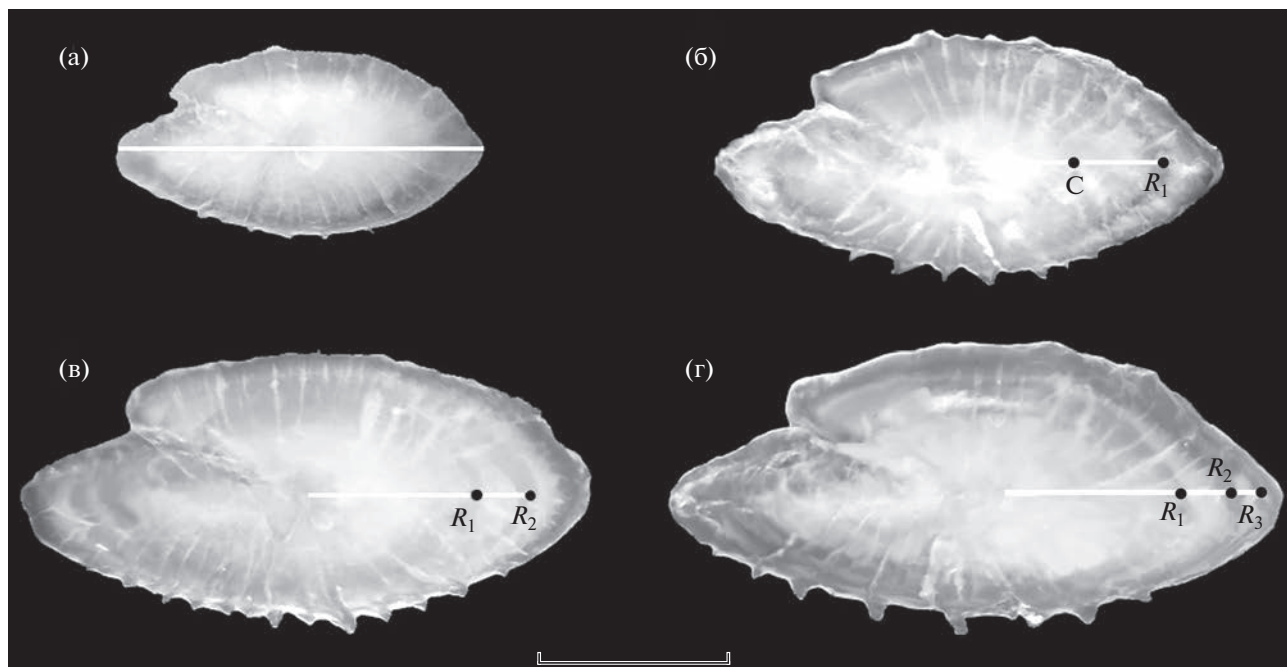


Рис. 2. Типичные отолиты особей азовской хамсы *Engraulis encrasicolus maeoticus* разных возрастных групп: а – сеголеток (возраст 0+, *TL* 78 мм), б – двухлеток (1+, 105 мм), в – трёхлеток (2+, 114 мм), г – четырёхлеток (3+, 128 мм); R_1 – R_3 – радиусы гиалиновых зон, С – дополнительное кольцо (чек). Масштаб: 1 мм.

87 (в среднем 70.9 ± 6.7) мм, масса – 0.73–3.69 (1.98 ± 0.62) г. В феврале 2019 г. в районе Анапы в зимовальных скоплениях азовской хамсы отмечено много молоди, а средние длина и масса зимующих сеголеток составили соответственно 66.6 ± 10.6 мм и 1.34 ± 0.64 г. Абсолютное большин-

ство отолитов рыб возраста 0+ в отражённом свете полностью матово-белые (рис. 2а). Средняя длина отолитов в октябре–ноябре была 1.88 ± 0.14 , а в феврале – 1.74 ± 0.29 мм (таблица). Радиус отолитов (от центра до заднего края) у этих рыб в среднем оценён соответственно в 945 ± 76 и 858 ± 147 мкм. Радиус

Длина и масса азовской хамсы *Engraulis encrasicolus maeoticus* разных возрастных групп, размеры отоликов и расстояния до годовых колец

Параметр	Возрастная группа			
	0+	1+	2+	3+
Азовское море, октябрь–ноябрь 2018 г.				
Число рыб, экз.	48	57	65	40
Общая длина рыбы, мм	$\frac{70.9 \pm 6.7}{55-87}$	$\frac{101.9 \pm 6.0}{86-113}$	$\frac{115.9 \pm 5.5}{106-128}$	$\frac{125.7 \pm 6.1}{114-139}$
Масса рыбы, г	$\frac{1.98 \pm 0.62}{0.73-3.69}$	$\frac{6.39 \pm 1.14}{3.97-8.99}$	$\frac{8.81 \pm 1.03}{5.79-11.36}$	$\frac{10.45 \pm 1.23}{7.38-13.30}$
Длина отоликов, мм	$\frac{1.88 \pm 0.14}{1.66-2.31}$	$\frac{2.66 \pm 0.13}{2.14-2.98}$	$\frac{2.94 \pm 0.15}{2.69-3.30}$	$\frac{3.17 \pm 0.13}{2.91-3.46}$
Радиус отоликов, мкм	$\frac{945 \pm 76}{792-1131}$	$\frac{1302 \pm 66}{1162-1431}$	$\frac{1428 \pm 68}{1233-1600}$	$\frac{1536 \pm 83}{1420-1792}$
Радиус гиалиновой зоны, мкм:				
R_1		$\frac{929 \pm 66}{772-1131}$	$\frac{924 \pm 95}{723-1124}$	$\frac{920 \pm 112}{734-1190}$
R_2			$\frac{1229 \pm 80}{1061-1392}$	$\frac{1205 \pm 83}{1040-1361}$
R_3				$\frac{1307 \pm 70}{1207-1550}$
Чёрное море (район г. Анапа), февраль 2019 г.				
Число рыб, экз.	63	73	26	8
Общая длина рыбы, мм	$\frac{66.6 \pm 10.6}{48-86}$	$\frac{101.5 \pm 6.3}{87-114}$	$\frac{114.7 \pm 4.6}{107-124}$	$\frac{119.3 \pm 3.7}{107-124}$
Масса рыбы, г	$\frac{1.34 \pm 0.64}{0.45-3.02}$	$\frac{5.25 \pm 1.08}{3.01-7.49}$	$\frac{7.28 \pm 1.03}{5.39-8.57}$	$\frac{8.44 \pm 1.45}{6.75-10.68}$
Длина отоликов, мм	$\frac{1.74 \pm 0.29}{1.23-2.32}$	$\frac{2.69 \pm 0.14}{2.20-2.96}$	$\frac{2.93 \pm 0.19}{2.50-3.31}$	$\frac{3.04 \pm 0.26}{2.61-3.39}$
Радиус отоликов, мкм	$\frac{858 \pm 147}{601-1162}$	$\frac{1227 \pm 84}{992-1471}$	$\frac{1448 \pm 109}{1209-1609}$	$\frac{1515 \pm 105}{1324-1690}$
Радиус гиалиновой зоны, мкм:				
R_1		$\frac{961 \pm 78}{787-1122}$	$\frac{921 \pm 94}{720-1159}$	$\frac{931 \pm 107}{720-1159}$
R_2			$\frac{1220 \pm 86}{1064-1364}$	$\frac{1213 \pm 127}{1020-1371}$
R_3				$\frac{1365 \pm 87}{1223-1495}$

Примечание. Над чертой – среднее значение и стандартное отклонение, под чертой – пределы варьирования показателя.

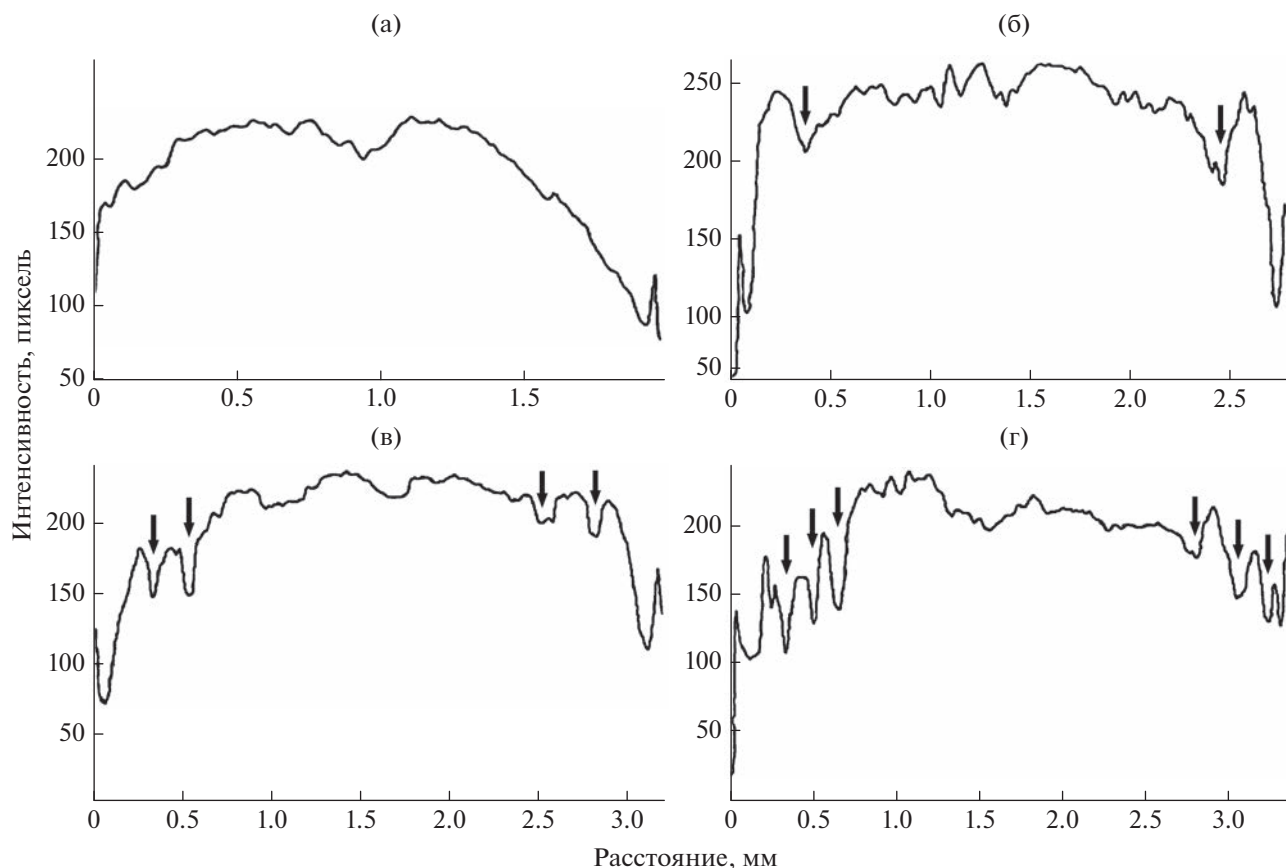


Рис. 3. Профили интенсивности отражённого света вдоль трансекты по длине отолида особей азовской хамсы *Engraulis encrasicolus maoticus* разных возрастных групп: а – сеголетка (возраст 0+, TL 78 мм), б – двухлетка (1+, 105 мм), в – трёхлетка (2+, 114 мм), г – четырёхлетка (3+, 128 мм); (↓) – положение тёмных гиалиновых зон.

отолида больше, чем радиус конца светлой опаковой зоны примерно на ширину узкой тёмной зоны по краю отолида (~90 мкм). Изредка в отолидах сеголеток наблюдали узкое, иногда неполное, кольцо, расположенное на расстоянии 300–790 мкм (в среднем 525 ± 117 мкм) от центра, составлявшее примерно 58% радиуса отолида. На профиле распределения интенсивности света вдоль изображения отолида сеголетки заметно небольшое понижение вблизи центра отолида, затем повышение линии с обеих сторон от центра в светлой опаковой зоне и постепенное её понижение к краям отолида (рис. 3). Резкий пик в конце профиля, как указано выше, можно объяснить преломлением света на краях отолида.

Размеры отобранных для исследования рыб возрастной группы 1+ составили в среднем ~102 мм, а длина их отолидов была 2.66 ± 0.13 мм в октябре–ноябре 2018 г. и 2.69 ± 0.14 мм в феврале 2019 г. Внутри отолида хорошо просматривалось одно тёмное гиалиновое кольцо (R_1), за которым следует светлая опаковая зона (рис. 2б). Гиалиновое кольцо располагалось на расстоянии 772–1131 мкм от центра к задней части отолида, в среднем 929 ± 66 мкм

в октябре–ноябре 2018 г. и 961 ± 78 мкм в феврале 2019 г. Ширина тёмной зоны варьировала от 40 до 100 мкм. Наличие гиалинового кольца просматривается в виде понижений линии профиля света вначале и в конце графика, которые отмечены стрелками (рис. 3б).

Средняя длина тела рыб в возрасте 2+ была ~115–116 мм. Размеры отолидов увеличились в среднем до 2.93–2.94 мм. В этих отолидах можно наблюдать две тёмные гиалиновые зоны (рис. 2в). Радиус середины первой зоны (R_1) в исследованные месяцы составил в среднем 921 и 924 мкм, а расстояние от центра до середины второй тёмной зоны (R_2) – 1220 и 1229 мкм. Ширина первой тёмной гиалиновой зоны варьировала от 30 до 80 мкм, второй – 20–60 мкм. На графиках профиля заметно по два минимума в передней и задней частях, отмеченные стрелками (рис. 3в).

Длина тела рыб возрастной группы 3+ составила в среднем 125.7 мм в октябре–ноябре 2018 г. и 119.3 мм в феврале 2019 г. Средняя длина отолидов увеличилась соответственно до 3.17 и 3.04 мм. На этих отолидах можно наблюдать уже три тём-

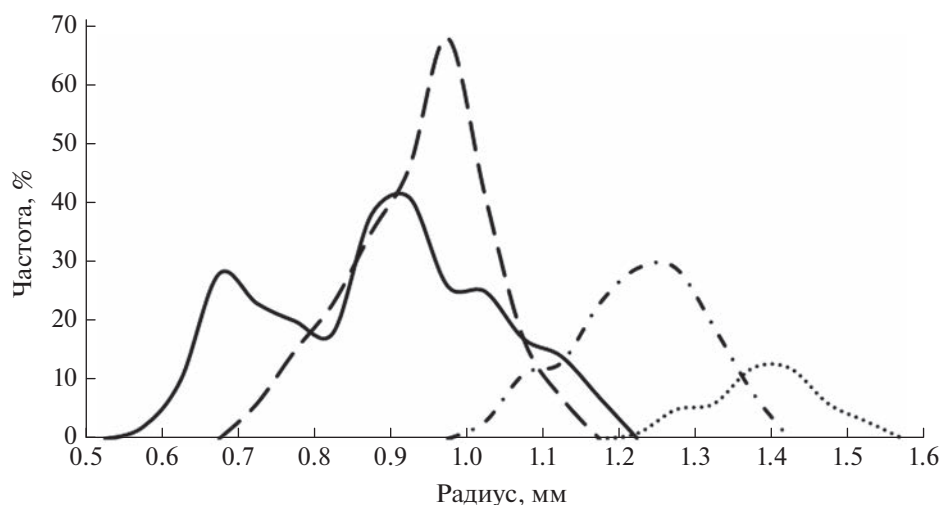


Рис. 4. Частоты распределения радиусов отолитов сеголеток (—) и радиусов до середины гиалиновых зон (годовых колец) у особей разных возрастных групп азовской хамсы *Engraulis encrasicolus maeoticus*: (---) — 1+, (- · -) — 2+, (· · ·) — 3+.

ных кольца (рис. 2г), располагающихся от центра на расстоянии в среднем 920 и 931 мкм (R_1), 1205 и 1213 мкм (R_2), 1307 и 1365 мкм (R_3) соответственно в октябре—ноябре и феврале. На графике профиля отолита четырёхлетки выделяются по три минимума в передней и задней части, соответствующие положению трёх годовых гиалиновых колец (рис. 3г).

Правильность определения возраста была проверена с применением анализа частотного распределения радиусов середины тёмных гиалиновых зон (рис. 4). Распределения радиусов колец R_1 , R_2 , R_3 были нормальными согласно тесту Колмогорова—Смирнова ($p > 0.05$) и одномодальными. При этом распределение радиусов отолитов сеголеток (R_{0+}) оказалось двухмодальным, что соответствовало наличию двух размерных групп.

ОБСУЖДЕНИЕ

Необходимость определения радиусов годовых колец в отолитах азовской хамсы возникла в связи с тем, что в протоколе определения возраста европейского анчоуса (ICES, 2017) на основании работы Уриарте с соавторами (Uriarte et al., 2016) описано множество дополнительных (ложных) колец, так называемых чеков (C — check) — C05, C08, C12, C15, C18, C22, C25. Первая цифра обозначает возрастную класс, а вторая — примерное расстояние ожидаемого годового прироста отолита (20, 50 или 80%). Кроме того, в работе Эрнандес с соавторами (Hernández et al., 2013) на основе анализа отолитов отловленного осенью европейского анчоуса из Бискайского залива показано, что часто встречающееся тёмное кольцо, расположенное на расстоянии в среднем 0.8 мм от центра, формируется примерно на 90-е сут жизни

рыб, поэтому оно является чеком, а не годовым кольцом. Положение о том, что кольцо, находящееся на расстоянии $< 850 \pm 100$ мкм от центра отолита, должно считаться ложным чеком вошло в протокол определения возраста европейского анчоуса из Восточной Атлантики и Средиземного моря (ICES, 2017, 2020). Однако на совещании в Турции это правило не было принято, и рабочая группа решила, что пока не будут проведены исследования радиусов годовых колец у азовских и черноморских анчоусов, первое полное и хорошо выраженное кольцо следует принимать за первое годовое кольцо, не учитывая расстояние от ядра отолита (Akkus, 2019).

В настоящей работе особое внимание уделено анализу структуры и размеров отолитов сеголеток хамсы, чтобы определиться с закладкой первого годового кольца. Радиус отолитов сеголеток составил в среднем 0.86–0.95 мм, при этом расстояние от центра до конца светлой опаковой зоны — 0.78–0.88 мм. Интересно отметить, что в наших исследованиях выявлены две размерные группы сеголеток с модальными размерными классами TL 50–55 и 75–80 мм, причём мелкие сеголетки появились в уловах в феврале 2019 г. У самых мелких сеголеток TL 48–55 мм (22 экз.) из февральской пробы расстояние от центра отолита до конца светлой опаковой зоны варьировало от 0.54 до 0.72 (в среднем 0.63 ± 0.04) мм. Размеры отолитов сеголеток и ширина опаковой зоны позволяют представить местоположение первого годового кольца и уточнить наличие дополнительных колец в первый год жизни. Как указано выше, в отолитах некоторых сеголеток отмечено находящееся на расстоянии в среднем 0.53 ± 0.12 мм от центра кольцо, которое можно считать ложным, так

как его радиус меньше, чем радиус отолитов у самых мелких сеголеток.

В отношении методики измерения радиусов годовых и ложных колец нужно подчеркнуть, что Эрнандес с соавторами (Hernández et al., 2013) проводили измерения от центра отолита до внутреннего края тёмного кольца, потому что у многих анчоусов внешнее гиалиновое кольцо не было полностью сформировано. В настоящей работе выбрана методика, при которой минимальные значения интенсивности отражённого света приходились примерно на середину тёмной зоны. Радиусы годовых колец у азовской хамсы по осреднённым данным составили: $R_1 - 0.94 \pm 0.09$ мм ($n = 262$), $R_2 - 1.23 \pm 0.08$ мм ($n = 135$) и $R_3 - 1.40 \pm 0.07$ мм ($n = 45$). Эти радиусы значительно меньше, чем у европейского анчоуса из Бискайского залива, которые были оценены соответственно в 1.30 ± 0.15 , 1.59 ± 0.13 и 1.75 ± 0.12 мм (Hernández et al., 2013). Измеренные расстояния в обоих случаях немного меньше радиусов соответствующих “истинных” годовых колец, тем не менее они позволяют представить типичное положение годовых колец и помогают определиться с дополнительными кольцами в отолитах рыб.

Очевидно, что скорость роста и размеры особей разных возрастных групп рыб существенно меняются в разные годы в зависимости от температуры воды, гидролого-гидрохимического её режима и особенно качества корма и обеспеченности пищей. При благоприятных условиях роста рыб их отолиты более крупные с более широкой опаковой зоной, поэтому радиусы годовых колец могут значительно различаться. Известно, что азовский подвид хамсы достигает меньшей максимальной длины и имеет темп роста ниже, чем у атлантических, средиземноморских и даже черноморских анчоусов (Шевченко, 1980; Chashchin, 1996; Chesalin et al., 2020). Вероятно, что и абсолютные размеры отолитов и радиусов годовых колец у разных форм европейского анчоуса и в разные годы будут различны, тем не менее подобные исследования нужны и помогут в верификации возраста рыб.

В целом подход к измерению расстояний от центра до годовых колец с использованием программы ImageJ можно отнести к дополнительным средствам изучения возраста организмов по слоистым структурам. Очевидно, что он показывает лучшие результаты, когда зоны более контрастные, без плавных переходов, а пики яркости света лучше выражены и могут быть легко подсчитаны. Этот процесс может быть автоматизирован, однако к результатам нужно относиться с большой осторожностью. Как показали многочисленные исследования, компьютерные системы до настоящего времени не позволили перейти от субъективных оценок возраста к автоматизированным объективным оценкам. Морисон с соавторами (Morison et al.,

2005) заметили, что ни одна из лабораторий по оценке возраста рыб не смогла заменить экспертов компьютерной техникой.

Основная проблема заключается в том, что простой подсчёт количества колец или пиков на графиках может привести к неправильным оценкам возраста рыбы, так как на некоторых отолитах имеются дополнительные кольца (нерестовые, неполные, двойные, ложные), особенно в центральной части, в которой они появляются в основном в первые годы жизни. Формирование годовых колец имеет региональные особенности и происходит в разные периоды года, что также необходимо учитывать при определении возраста. В настоящее время только хороший эксперт может отличить годовые и дополнительные кольца и дать их правильную интерпретацию, учитывая периоды роста, нереста и другие биологические особенности вида. Поэтому полностью автоматизированные системы определения возраста рыб по регистрирующим структурам пока отсутствуют. Тем не менее современное развитие техники анализа изображений, компьютерного зрения и автоматической обработки данных должно найти своё применение и при оценке возраста рыб, чтобы перейти от субъективных оценок к автоматизированным объективным оценкам.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование проведено в рамках государственного задания “Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом” (№ 121041400077-1), а также при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований “Отклик черноморской пелагической экосистемы на изменение климата в регионе (на примере медуз, гребневиков и мелких пелагических рыб)” (проект № АААА-А18-118081390041-0).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Васильков В.П. 1979. Изучение ритмов роста методом математического спектрального анализа склеритогамм чешуи. М.: Изд-во МГУ, 24 с.
- Васильков В.П. 2006. Анализ цифровых изображений кальцифицированных структур для оценки возрастных маркеров. Владивосток: Изд-во ВГУЭС, 226 с.
- Васильков В.П. 2007. Применение анализа цифровых изображений для оценивания возраста промысловых объектов // Изв. ТИНРО. Т. 149. С. 138–161.
- Васильков В.П. 2009. Методы и алгоритмы обработки изображений и сигналов для выделения и оценки временных маркеров в биологических слоистых структурах // Мат. биология и биоинформатика. Т. 4. Вып. 1. С. 21–35. <https://doi.org/10.17537/2009.4.21>

- Васильков В.П., Левада Т.П. 1977. Опыт машинного определения возраста у рыб Тихого океана // Экспресс-информация ЦНИИТЭИРХ. Вып. 7. С. 12–17.
- Воловик С.П., Козлитина С.В. 1983. Об оценке возможного улова азовской хамсы *Engraulis encrasicolus* (L.) (Engraulidae) в связи с ростом и структурой ее популяции // Вопр. ихтиологии. Т. 23. Вып. 1. С. 27–38.
- Дементьева Т.Ф. 1958. Методика изучения влияния естественных факторов на численность азовской хамсы // Тр. ВНИРО. Т. 44. С. 30–62.
- Корнилова В.П. 1960. Биология и промысел азовской хамсы (*Engraulis encrasicolus maeoticus* Pus.) // Тр. Аз.-Черномор. НИИ рыб. хоз-ва и океанографии. Вып. 18. С. 50–73.
- Мина М.В. 1965. О разработке метода объективной оценки структуры зон на отолидах рыб // Вопр. ихтиологии. Т. 5. Вып. 4 (37). С. 732–735.
- Мина М.В. 1967. Отолит как регистрирующая структура. М.: Изд-во МГУ, 13 с.
- Попова В.П. 1954. Черноморский период жизни азовской хамсы // Тр. ВНИРО. Т. 28. С. 65–74.
- Чугунова Н.И. 1959. Руководство по изучению возраста и роста рыб (методическое пособие по ихтиологии). М.: Изд-во АН СССР, 164 с.
- Шевченко Н.Ф. 1980. Географическая изменчивость анчоуса в морях средиземноморского бассейна // Вопр. ихтиологии. Т. 20. № 1. С. 20–31.
- Шляхов В.А., Шляхова О.В., Надолинский В.П., Перевалов О.А. 2018. Промыслово-биологические показатели рыболовства для важнейших распределенных запасов водных биоресурсов Черного моря как основа их регионального оценивания // Вод. биоресурсы и среда обитания. Т. 1. № 1. С. 86–103.
https://doi.org/10.47921/2619-1024_2018_1_1_86
- Abrahamoff M., Magalhães P., Ram S. 2004. Image processing with ImageJ // Biophotonics Int. V. 11. № 7. P. 36–42.
- Akkus G., Chashchin A.K., Gucu A.C. 2019. Otolith age reading protocols for the anchovy and their applicability to the Black Sea region // Report of FAO-GFCM Workshop on age reading of selected Black Sea species (anchovy and rapa whelk). Trabzon: FAO-GFCM. P. 30–35.
- Astudillo A., Lucio P., Prouzet P., Uriarte A. 1990. Summary of the results concerning the otolith reading exercise on anchovy held in San Sebastián (Spain) in January 1990 // Working Document to the 1990 ICES Working Group on the assessment of the Stocks of sardine, horse mackerel and anchovy. Copenhagen: ICES, 123 p.
- Bonhomme F., Meyer L., Arbiol C. et al. 2021. Systematics of European coastal anchovies (genus *Engraulis* Cuvier) // J. Fish Biol. V. 100. № 2. P. 594–600.
<https://doi.org/10.1111/jfb.14964>
- Cailliet G.M., Botsford L.W., Brittnacher J.G., et al. 1996. Development of a computer-aided age determination system: evaluation based on otoliths of bank rockfish off California // Trans. Am. Fish. Soc. V. 125. № 6. P. 874–888.
[https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1996\)125<0874:DOA-CAA>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1996)125<0874:DOA-CAA>2.3.CO;2)
- Campana S. 1987. Image analysis for microscope based observation: an inexpensive configuration // Can. Techn. Rep. Fish. Aquat. Sci. № 1569. 20 p.
- Carbonara P., Follesa M.C. (eds.). 2019. Handbook on fish age determination: a Mediterranean experience // Studies and Reviews. № 98. Rome: FAO. 180 p.
- Chashchin A. 1996. The Black Sea populations of anchovy // Sci. Mar. V. 60. Suppl. 2. P. 219–225.
- Chesalin M., Nikolsky V., Yuneva T. 2020. Biological characteristics of Azov anchovy (*Engraulis encrasicolus maeoticus* A.) in 2016–2017 and 2017–2018 fishing seasons // Turk. J. Fish. Aquat. Sci. V. 20. № 7. P. 559–570
https://doi.org/10.4194/1303-2712-v20_7_06
- Denechaud C., Thorsen A., Vischer N. 2018. ObjectJ: Measuring growth rings in fish otoliths, 5 p. (https://sils.fnwi.uva.nl/bcb/objectj/examples/otoliths/MD/Tutorial_Otoliths_ObjectJ.pdf. Version 07/2022).
- Fablet R. 2006. Statistical learning applied to computer-assisted fish age and growth estimation from otolith images // Fish. Res. V. 81. № 2–3. P. 219–228.
<https://doi.org/10.1016/j.fishres.2006.07.013>
- Fablet R., Pujolle S., Chessel A. et al. 2008. 2D image-based reconstruction of shape deformation of biological structures using a level-set representation // Comput. Vis. Image Underst. V. 111. № 3. P. 295–306.
<https://doi.org/10.1016/j.cviu.2007.12.005>
- Fawel J. 1974. The use of image analysis in the ageing of fish // The ageing of fish. London: Unwin Brothers. P. 103–107.
- Fisher M., Hunter E. 2018. Digital imaging techniques in otolith data capture, analysis and interpretation // Mar. Ecol. Prog. Ser. V. 598. P. 213–231.
<https://doi.org/10.3354/meps12531>
- Formella A., Vazquez J.M., Cernadas E., et al. 2007. Age reading of cod otoliths based on image morphing, filtering and Fourier analysis // Proc. 7th IASTED Int. Conf. on visualization, imaging, and image processing, VIIP 2007. Anaheim: ACTA Press. P. 207–212.
- Frie R.V. 1982. Measurements of fish scales and back-calculation of body lengths using a digitizing pad and microcomputer // Fisheries. V. 7. № 5. P. 5–8.
[https://doi.org/10.1577/1548-8446\(1982\)007<0005:MOF-SAB>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8446(1982)007<0005:MOF-SAB>2.0.CO;2)
- Geraghty P.T., Jones A.S., Stewart J., Macbeth W.G. 2012. Micro-computed tomography: an alternative method for shark ageing // J. Fish Biol. V. 80. № 5. P. 1292–1299.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2011.03188.x>
- Gonçalves P., Silva V., Murta A., et al. 2017. Image Analysis as a tool to age estimations in fishes: An approach using Blue Whiting on ImageJ // Technological innovation for smart systems. DoCEIS 2017. IFIP advances in information and communication technology. V. 499. Cham: Springer. P. 167–174.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-56077-9_15
- Hernández C., Villamor B., Barrado J. et al. 2013. Validation of the first annulus in young of the year anchovy and sardine // Workshop on micro increment daily growth in European anchovy and sardine (WKMIAS). ICES CM 2013/ACOM:51. Copenhagen: ICES. P. 32–37.
- ICES. 2010. Report of the Workshop on age reading of European anchovy (WKARA). ICES CM 2009/ACOM:43. Copenhagen: ICES, 122 p.
- ICES. 2017. Report of the Workshop on age estimation of European anchovy (*Engraulis encrasicolus*). ICES CM 2016/SSGIEOM:17. Copenhagen: ICES, 223 p.

- ICES. 2019. ICES SmartDots Web Application Manual, 20 p. <https://doi.org/10.17895/ices.pub.4603>
- ICES. 2020. Workshop on age validation studies of small pelagic species (WKVALPEL) // ICES Sci. Rep. V. 2. № 15. 76 p. <https://doi.org/10.17895/ices.pub.5966>
- Macy W.I. 1995. The application of digital image processing to aging of long-finned squid, *Loligo pealei*, using the statolith // Recent developments in fish otolith research. Columbia: Univ. South Carolina Press. P. 283–302.
- Mahé K. 2009. Project № 044132. Automated fish ageing (AFISA): final activity report. Boulogne-sur-Mer: IFREMER, 174 p. (www.ices.dk/about-ICES/projects/EU-RFP/EU%20Repository/AFISA/FP6%20AFISA%20Final%20Activity%20Report.pdf. Version 07/2022).
- Mahé K., Fave S., Couteau J. 2011. TNPC User guide. Brest et al.: IFREMER et al., 74 p. (<http://archimer.ifremer.fr/doc/00032/14288>. Version 07/2022).
- McGowen M., Prince E., Lee D. 1987. An inexpensive microcomputer-based system for making rapid and precise counts and measurements of zonation in video displayed skeletal structures of fish // Age and growth of fish. Ames: Iowa State Univ. Press. P. 385–395.
- Messiah S.N., MacDougal C., Claytor R. 1989. Separation of Atlantic herring stocks in the southern Gulf of St. Lawrence using digitized otolith morphometrics and discriminant function analysis // Can. Techn. Rep. Fish. Aquat. Sci. № 1647. 22 p.
- Metscher B.D. 2009. MicroCT for comparative morphology: simple staining methods allow high-contrast 3D imaging of diverse non-mineralised animal tissues // BMC Physiol. V. 9. Article 11. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-9-11>
- Moore B.R., Maclaren J., Peat C., et al. 2019. Feasibility of automating otolith ageing using CT scanning and machine learning // New Zealand Fish. Assessment Report 2019/58, 23 p. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.29670.16960>
- Morison A.K., Burnett J., McCurdy W.J., Moksness E. 2005. Quality issues in the use of otoliths for fish age estimation // Mar. Freshw. Res. V. 56. № 5. P. 773–782. <https://doi.org/10.1071/MF04217>
- Nava E., Villar E.I., Clemente M.C., et al. 2018. Digital imaging tool to enhance otolith microstructure for estimating age in days in juvenile and adult fish // IEEE J. Ocean. Eng. V. 43. № 1. P. 48–55. <https://doi.org/10.1109/JOE.2016.2644998>
- Palmer M., Álvarez A., Tomás A., Morales-Nin B. 2005. A new method for robust feature extraction of otolith growth marks using fingerprint recognition methods // Mar. Freshw. Res. V. 56. № 5. P. 791–794. <https://doi.org/10.1071/MF04207>
- Panfili J., Ximenes M.-C., Do Chi T. 1990. Age determination of eels in the French Mediterranean lagoons using classical methods and an image analysis system // Int. Rev. Ges. Hydrobiol. Hydrogr. V. 75. № 6. P. 745–754. <https://doi.org/10.1002/iroh.19900750608>
- Panfili J., de Pontual H., Troadec H., Wright P.J. 2002. Manual of fish sclerochronology. Brest: IFREMER-IRD, 464 p.
- Parsons K.T., Maisano J., Gregg J., et al. 2018. Age and growth assessment of western North Atlantic spiny butterfly ray *Gymnura altavela* (L. 1758) using computed tomography of vertebral centra // Environ. Biol. Fish. V. 101. № 1. P. 137–151. <https://doi.org/10.1007/s10641-017-0687-x>
- Robertson S.G., Morison A.K. 1999. A trial of artificial neural networks for automatically estimating the age of fish // Mar. Freshw. Res. V. 50. № 1. P. 73–82. <https://doi.org/10.1071/MF98039>
- Takashima Y., Takada T., Matsuishi T., Kanno Y. 2000. Validation of auto-counting method by NIH image using otoliths of white-spotted char *Salvelinus leucomaenis* // Fish. Sci. V. 66. № 3. P. 515–520. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2000.00081.x>
- Troadec H. 1991. Frequency demodulation on otolith numerical images for the automation of fish age estimation // Aquat. Living Resour. V. 4. № 4. P. 207–219. <https://doi.org/10.1051/alr:1991022>
- Troadec H., Benzinou A., Rodin V., Le Bihan J. 2000. Use of deformable template for two-dimensional growth ring detection of otoliths by digital image processing: Application to plaice (*Pleuronectes platessa*) otoliths // Fish. Res. V. 46. № 1–3. P. 155–163. [https://doi.org/10.1016/S0165-7836\(00\)00142-9](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(00)00142-9)
- Uriarte A. 2002. 2001 Anchovy otolith exchange programme from subarea VIII and Division IXa // Annex to PELASS-ES report. EU study Project. EC DG XIV Contract №99/010. Copenhagen: ICES, 12 p. (<https://www.ices.dk/community/Documents/PGCCDBS/ANCHOVY%20OTOLITH%20EXCHANGE%20REPORT%202001.pdf>. Version 07/2022).
- Uriarte A., Dueñas C., Duhamel E., et al. 2007. 2006 Anchovy otolith workshop // Working Document to the 2007 ICES Planning Group on Commercial Catch, Discards and Biological Sampling (PGCCDBS). ICES CM 2007/ACFM:09. Copenhagen: ICES, 58 p. (https://www.ices.dk/community/Documents/PGCCDBS/ANCHOVY%20OTOLITH%20WORKSHOP%202006_REPORT_DEF.PDF. Version 07/2022).
- Uriarte A., Rico I., Villamor B., et al. 2016. Validation of age determination using otoliths of the European anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) in the Bay of Biscay // Mar. Freshw. Res. V. 67. № 7. P. 951–966. <https://doi.org/10.1071/MF15092>
- Villamor B., Uriarte A. 1996. Results of the anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) exchange programme in 1996 // Working Document to the 1996 ICES Working Group on the assessment of mackerel, horse mackerel, sardine and anchovy. Copenhagen: ICES, 7 p. (<https://www.ices.dk/community/Documents/PGCCDBS/Anchovy%20Otolith%20Exchange%201996.pdf>. Version 07/2022)
- Vitale F., Worsøe Clausen L., Ní Chonchúir G. (eds.) 2019. Handbook of fish age estimation protocols and validation methods. ICES Coop. Res. Rept. № 346. 180 p. <https://doi.org/10.17895/ices.pub.5221>
- Welleman H., Storbeck F. 1995. Automatic ageing of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) otoliths by means of image analysis // Recent developments in fish otolith research. Columbia: Univ. South Carolina Press. P. 271–282.
- Whitman G., Johnson R.C. 2016. Imaging of otoliths for analysis of fish age and growth: a guide for measuring daily increments in adult and juvenile otoliths using Image-Pro Premier®, Davis: Univ. California, Center Watershed Sci., 10 p.