

**Федеральное агентство по рыболовству
Федеральное государственное унитарное предприятие
«Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр»
(ФГУП «ТИНРО-Центр»)**

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ
ЖИЗНЕСТОЙКОЙ МОЛОДИ ТРЕПАНГА
В ЗАВОДСКИХ УСЛОВИЯХ**

Владивосток
2012

Инструкция по технологии получения жизнестойкой молоди трепанга в заводских условиях / сост. Н.Д. Мокрецова, Г.И. Викторовская, И.Ю. Сухин, В.Д. Дзизюров, Г.Н. Курганский, О.Б. Гостюхина ; Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр. — Владивосток : ТИНРО-Центр, 2012. — 81 с.

Настоящая инструкция является результатом работ по внедрению разработанной в ФГУП «ТИНРО-Центр» технологии культивирования трепанга в заводских условиях, проведенных на базе цеха НПЦМ «Заповедное». В ходе разработки инструкции были отработаны все этапы и аспекты технологии массового получения молоди дальневосточного трепанга. Решен ряд проблем, которые ранее при проведении исследований в лабораторных условиях не возникали и не могли быть решены. Инструкция содержит сведения о технологическом оборудовании для культивирования трепанга, детальное описание санитарной обработки помещений и оборудования. Описаны все основные этапы культивирования дальневосточного трепанга: работы с производителями (включая особенности биологии размножения), получение и выращивание эмбрионов и личинок, выращивание осевшей молоди. Описаны основные заболевания трепанга и меры борьбы с ними, даны методические рекомендации по культивированию кормовых микроводорослей. Методические и научные данные, приведенные в данной инструкции, могут быть полезны при проектировании и эксплуатации аналогичных предприятий по культивированию трепанга.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИИ РАЗМНОЖЕНИЯ ДАЛЬНЕВОСТОЧ- НОГО ТРЕПАНГА.....	5
Глава 2. ТЕХНОЛОГИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ТРЕПАНГА.....	9
Работы с производителями.....	9
Оценка состояния половых продуктов производителей, сроки их отлова и доставки на завод.....	9
Адаптация производителей.....	11
Стимуляция нереста трепанга.....	12
Получение и выращивание эмбрионов и личинок.....	13
Оплодотворение яйцеклеток и получение эмбрионов.....	13
Развитие личинок и условия их выращивания.....	18
Трофические потребности и режим кормления личинок.....	23
Осаждение личинок и выращивание молоди.....	24
Условия выращивания молоди. Состав и концентрация корма для молоди и режим ее кормления.....	24
Адаптация молоди к условиям района расселения.....	29
Глава 3. БОЛЕЗНИ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ТРЕПАНГА НА РАЗНЫХ СТА- ДИЯХ ОНТОГЕНЕЗА. МОНИТОРИНГ ЗАБОЛЕВАНИЙ, МЕРЫ ИХ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И БОРЬБЫ С НИМИ.....	31
Болезни личинок.....	32
Заболевания молоди и производителей.....	33
Глава 4. САНИТАРНАЯ ОБРАБОТКА ПОМЕЩЕНИЙ И ОБОРУДОВАНИЯ И ПРОВЕДЕНИЕ ПРОТИВОЭПИЗООТИЧЕСКИХ МЕРОПРИЯТИЙ.....	38
Глава 5. МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО КУЛЬТИВИРОВАНИЮ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ.....	42
Питательные среды для культивирования микроводорослей.....	43
Концентрированные растворы для приготовления питательных сред (табл. 8, 9).....	44
Приготовление питательной среды.....	45
Содержание коллекционных культур микроводорослей.....	45
Подготовка посуды.....	45
Подготовка морской воды.....	46
Методы учета численности клеток микроводорослей.....	46
Пересев и хранение коллекционных культур микроводорослей.....	47
Массовое культивирование микроводорослей.....	49
Выращивание промежуточной культуры микроводорослей.....	49
Приготовление пастеризованной морской воды.....	50
Подготовка фотореакторов.....	51
Приготовление питательной среды в фотореакторе.....	53
Посев водорослей.....	54
Глава 6. ТЕХНИЧЕСКОЕ ОСНАЩЕНИЕ ЗАВОДА ПО ПОЛУЧЕНИЮ МО- ЛОДИ ТРЕПАНГА.....	55
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	68
Приложение 1.....	70
Приложение 2.....	73
Приложение 3.....	74
Приложение 4.....	75
Приложение 5.....	76
Приложение 6.....	78

ВВЕДЕНИЕ

Дальневосточный трепанг издавна используется в качестве деликатесной и лечебной пищи в Приморье и странах АТР. В недалеком прошлом этот вид был широко распространен в прибрежных водах Приморья, наиболее высокие показатели численности и биомассы отмечались в зал. Петра Великого, Японского моря. С 1990-х гг. произошло значительное снижение численности трепанга в прибрежье Приморья.

Низкая численность трепанга, сложность оценки процессов пополнения и элиминации, а также отсутствие данных об истинных объемах его браконьерского промысла не позволяют сделать объективный прогноз восстановления его ресурсов за счет естественного воспроизводства.

В последние годы крайне редки случаи обнаружения личинок трепанга в планктоне, что ограничивает применение коллекторного способа получения его молоди для последующего выращивания.

Действенным способом пополнения скоплений и получения товарной продукции трепанга является применение технологии получения его молоди в заводских условиях. Такая технология в настоящее время широко используется в странах Азии, где природные популяции также имеют низкую численность. Высокая рыночная стоимость трепанга является предпосылкой для его культивирования и в Приморье.

Отработка технологии получения молоди трепанга в заводских условиях осуществлялась в НПЦМ «Заповедное».

Основной целью проводимых работ был подбор оптимальных условий, обеспечивающих лучшие показатели роста и выживаемости личинок и молоди трепанга. Разрабатывались методы стимуляции нереста производителей, при этом потребовались дополнительные исследования в области биологии размножения трепанга. Определялись оптимальные плотности содержания личинок и осаждаемой молоди, культивирование живых кормов (микроводорослей) и режимы кормления личинок и молоди.

Кроме этого, была разработана методика санитарной обработки систем жизнеобеспечения цеха, предупреждающая массовую гибель выращиваемых животных на всех стадиях их развития (от производителей до жизнестойкой молоди).

В настоящей инструкции изложены рекомендации и нормативы для выполнения всех этапов технологического процесса. Инструкция включает следующие основные разделы:

- особенности биологии размножения дальневосточного трепанга;
- технология культивирования трепанга;
- выращивание живых кормов (микроводорослей) для личинок трепанга;
- техническое оснащение завода по получению молоди трепанга.

Данная инструкция может быть использована при организации производств по получению жизнестойкой молоди трепанга в заводских условиях и может использоваться на заводах, расположенных в Приморье, на юге о. Сахалин и южных Курильских островах, т.е. в районах его обитания.

ГЛАВА 1. ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИИ РАЗМНОЖЕНИЯ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ТРЕПАНГА

Трепанг является раздельнополым животным, гермафродитизм у этого вида в литературе не описан. Внешние признаки полового диморфизма отсутствуют. Пол определяется только по цвету гонад при вскрытии животного или во время вымета половых продуктов. У самок цвет гонад ярко-оранжевый, у самцов — светло-бежевый, адекватный цвет имеют выметанные половые продукты. Соотношение самцов и самок трепанга в природных скоплениях близко к 1 : 1.

Трепанг имеет ветвистую непарную гонаду с половым протоком, проходящим по спинному мезентерию и открывающимся в переднем отделе тела у основания щупалец со спинной стороны. В нерестовый период половая железа трепанга заполняет почти всю полость. Форма у нее трубчатая, каждая трубочка ветвится и плотно заполнена зрелыми половыми клетками.

Масса гонад дальневосточного трепанга в течение годового цикла развития сильно изменяется, что находится в прямой зависимости от степени их зрелости. В преднерестовый период их масса максимальна. При этом гонадный индекс (процентное отношение массы гонады к массе кожно-мышечного мешка животного) на акваториях северного Приморья, к каковым относятся и бухты Мелководная, Киевка, Соколовская и ряд других, может достигать 6–14 %. В бухтах зал. Петра Великого гонадный индекс (ГИ) у голотурий достигает 22–30 % (Мокрецова, 1978).

При сравнении годовых циклов развития половых продуктов трепанга, обитающего в зал. Петра Великого и в бухтах северного Приморья, показано,

что развитие гамет у голотурий из этих районов одинаково, тогда как продолжительность и сезонная приуроченность стадий их зрелости значительно различаются. В бухте Новгородской зал. Петра Великого нерест голотурии начинается обычно в конце июня — начале июля и заканчивается в третьей декаде августа (Мокрецова, 1978). В зал. Восток нерест трепанга наблюдается с конца июля до середины августа. С середины августа почти все особи имеют опустошенную от половых клеток и редуцированную половую железу. У трепангов из открытых районов моря, взятых с глубины 30 м, наблюдается преднерестовое состояние гонад даже в конце августа (Касьянов и др., 1980; Касьянов, 1991). Н.Д. Мокрецовой (1978) выявлена межгодовая изменчивость в сроках наступления нереста в зал. Посыета, кроме того, отмечена несинхронность нерестового сезона в различных бухтах залива.

По литературным данным (Касьянов и др., 1980) нерест одной особи длится 1–3 сут. Период массового нереста дальневосточного трепанга значительно короче, чем общая продолжительность нерестового периода. Особенно сильно варьируют сроки начала нереста (Mitsukuri, 1903).

В северном Приморье период оптимального диапазона температур воды для развития личинок ограничен, нерест голотурии тоже проходит в более сжатые сроки. У единичных особей трепанга, обитающих в бухтах северного Приморья, зрелые гонады наблюдаются уже в первой декаде июля. Однако нерестовый период трепанга в этом районе наступает значительно позже. Это связано с тем, что созревание гонад и наступление нереста у иглокожих разделены по времени в 1–2 нед (Хотимченко и др., 1993). За этот период в нервных ганглиях и гонаде происходят значительные нейрогуморальные изменения, отвечающие за подготовку половозрелых гидробионтов к вымету половых продуктов. Производители, у которых подготовка к нересту не завершена, часто не реагируют на стимуляцию нереста в связи с блокировкой системы, отвечающей за подготовку гонады к вымету и непосредственно за вымет половых продуктов. Вследствие этого нерест в бухтах северного Приморья наблюдается в конце июля — начале августа, период нереста непродолжителен — до середины августа. Первые нерестящиеся особи в июле появляются на небольших глубинах в более прогреваемых участках. Нерест продолжается до второй декады августа и завершается на больших глубинах до середины августа. Массовый нерест трепанга в данном районе проходит в более короткий промежуток времени — приблизительно одну декаду. Первыми, как правило, начинают нереститься особи более крупных размеров, а затем мелкие.

Наибольшее количество зрелых гамет отмечается в июле перед нерестом. У самок дальневосточного трепанга зрелые гонады перед нерестом заполнены

свободнолежащими ооцитами, последняя стадия созревания гамет в яичнике завершается во время нереста, и выметываются уже яйцеклетки (рис. 1).

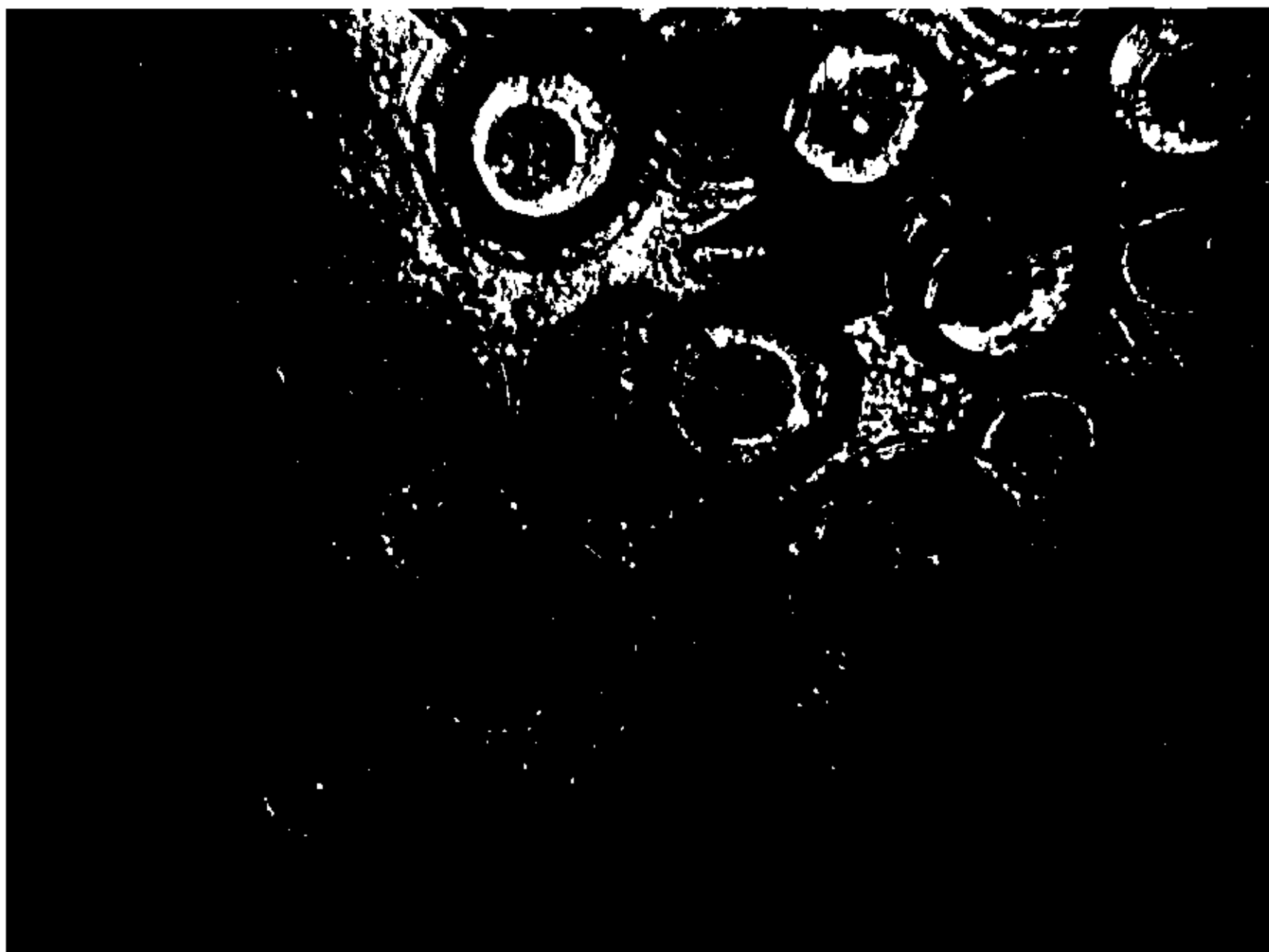


Рис. 1. Мазок зрелой гонады самки дальневосточного трепанга

В зал. Петра Великого размеры половых клеток в зрелых яичниках составляют 120–180 мкм (Касьянов и др., 1980). В зрелых гонадах голотурий, обитающих в бухтах северного Приморья, наблюдается большая вариабельность размеров свободнолежащих ооцитов — от 100 до 180 мкм. При этом доля гамет размерами 140 мкм и более, обеспечивающих высокую выживаемость эмбрионов и личинок, не превышает 30–40 %. В южном Приморье доля таких гамет находится на уровне 80–90 %. Во время нереста трепанга около 80 % половых клеток выметывается из гонады. Личинки, развивающиеся из клеток меньших размеров, или погибают на ранних стадиях развития или медленнее растут.

Наибольшие величины плодовитости характерны для особей с массой кожно-мускульного мешка (КММ) 180–220 г и более. Но такие особи в природе, как правило, немногочисленны, особенно в настоящее время. При проведении работ по культивированию трепанга в заводских условиях следует использовать производителей с массой кожно-мускульного мешка не менее 150 г. Плодовитость у таких особей довольно высокая, например в зал. Посьета она в среднем варьирует от 7 до 9 млн (Мокрецова, 1978).

Потенциальная плодовитость трепанга за пределами зал. Петра Великого (например, в бухтах Киевка и Мелководная) у отдельных особей может достигать почти 9 млн яйцеклеток. Максимальные ее значения варьируют от 6,8 до 8,8 млн, а средние — от 3 до 4 млн. Наибольшую потенциальную плодовитость имеют трепанги с массой КМК 150–200 г. У голотурий с ГИ 10–15 % самая большая плодовитость — около 5 млн яйцеклеток. После нереста в гонаде трепанга остается в среднем 600–800 тыс. яиц.

Для прибрежной зоны характерны значительные колебания температуры воды в разные сезоны года. В связи с этим половой цикл беспозвоночных, обитающих в этой зоне, сильно зависит от температуры воды. Рост и созревание половых клеток наблюдается при положительных температурах воды, нерест протекает в наиболее благоприятный период для развития личинок. При отрицательных температурах происходит резорбция половых клеток (Хотимченко и др., 1993).

В зависимости от места обитания трепанга в прибрежной зоне Приморья и температурных условий года сроки нереста трепанга различаются (рис. 2). Так, в зал. Петра Великого в «теплые» годы (среднегодовая температура воды — 9,2 °С) нерест более растянут и происходит в период с конца июня — начала июля до 20-х чисел августа. В «холодные» годы (среднегодовая температура — 8,2 °С) начало нереста запаздывает на полмесяца и происходит с середины июля и до конца августа (Мокрецова, 1978).

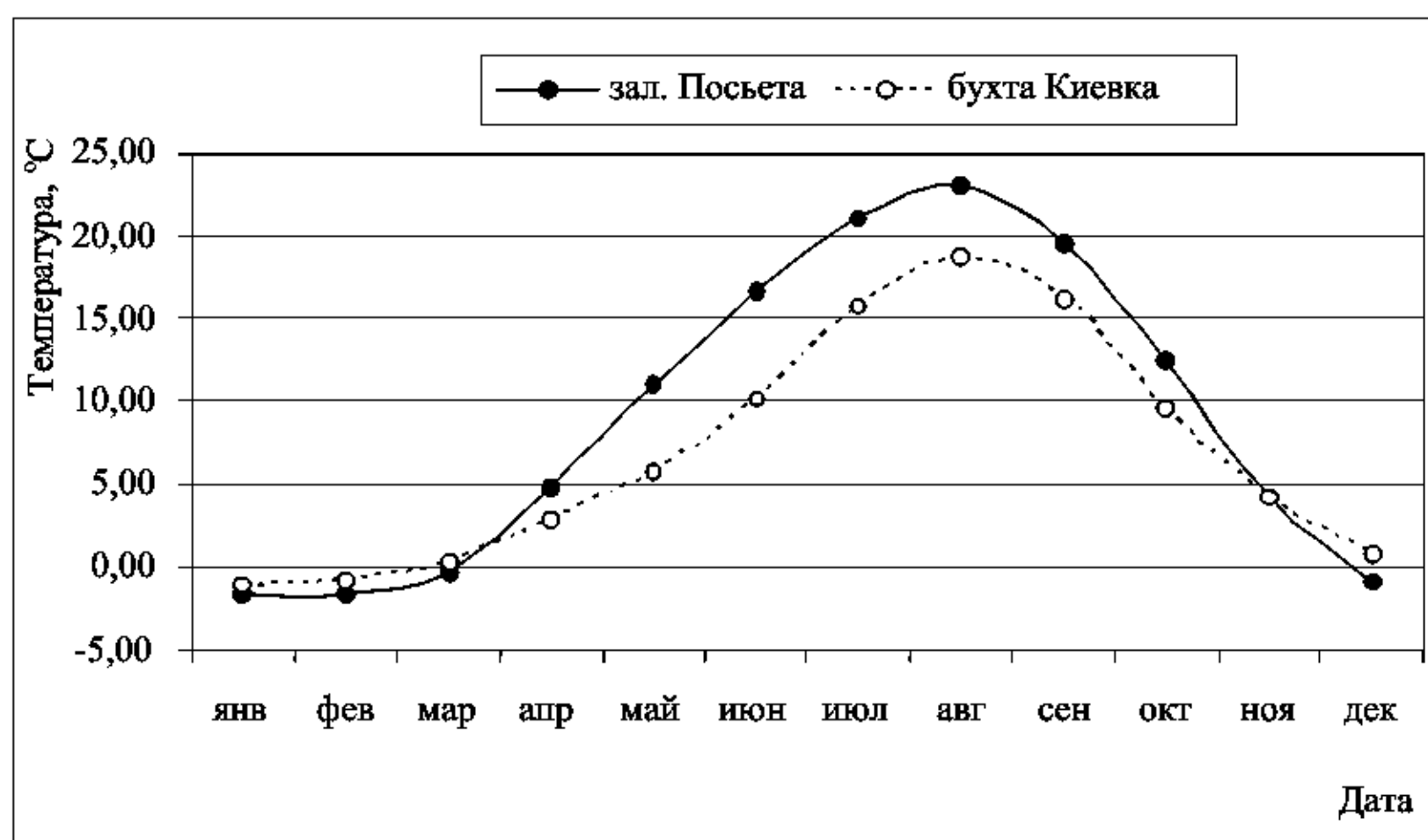


Рис. 2. Среднегодовая температура поверхности воды в зал. Посъета (по: Гайко, 2006) и в бухте Киевка (2004–2010 гг., собственные данные)

Основным фактором, определяющим сроки созревания половых продуктов трепанга и наступления нереста голотурий, является «сумма тепла», при которой они развиваются. Подсчет «тепла», необходимого для созревания половых продуктов и наступления нереста трепанга, следует осуществлять путем сложения положительных значений температуры воды с момента выхода голотурий из состояния покоя, который наступает после их нереста (со второй декады августа до конца сентября — начала октября) и до момента фиксирования отрицательных температур воды. Следующее суммирование температуры осуществляется весной с момента ее перехода через 0 °С и до наступления нереста. Сумма «тепла» поверхностного слоя воды для периода наступления нереста трепанга в зал. Петра Великого соответствует 1860–1880 °С, а для массового — 2350–2390 °С (Мокрецова, 1978). Величины этих показателей у дальневосточного трепанга, обитающего, в бухтах северного Приморья (на примере бухты Киевка), в осенний период составляют 340–530 градусо-дней. Весной (во второй фазе) они достигают 740–1040 градусо-дней. Таким образом, сумма «тепла» до периода наступления нереста трепанга соответствует 1080–1570 °С, а для массового нереста — 1250–1700 °С. Хозяйства, занимающиеся разведением трепанга в мелководных районах, в качестве индикатора готовности животных к нересту могут использовать значения поверхностных температур.

ГЛАВА 2. ТЕХНОЛОГИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ТРЕПАНГА

Работы с производителями

Оценка состояния половых продуктов производителей, сроки их отлова и доставки на завод

Основными критериями при отборе производителей для нереста в заводских условиях являются отсутствие травм на теле, масса тела и гонад, размерные, количественные и качественные характеристики половых клеток у самок.

При проведении работ по культивированию трепанга в заводских условиях необходимо учитывать, что более крупные особи созревают и начинают нерест раньше. С учетом этого обстоятельства, при отборе производителей предпочтение следует отдавать голотуриям с общей массой не менее 150 г, имеющих, как уже было отмечено ранее, довольно высокую плодовитость.

Особое внимание следует уделять информации по биологии размножения голотурии непосредственно в местах ее отлова, поскольку сроки созревания и нереста в разных районах сильно варьируют. В связи с чем необходим постоянный мониторинг за состоянием гонад трепанга в районе его отлова. Определено, что в зал. Петра Великого мониторинг состояния гонад необходимо начинать с середины мая, в северных районах Приморья — с середины июня. Оценка состояния гонад осуществляется по показателю гонадного индекса, который определяется по формуле:

$$\text{ГИ} = m_{\text{гон}}/m_{\text{кмм}} \cdot 100 \%,$$

где ГИ — гонадный индекс, %; $m_{\text{гон}}$ — масса гонад, г; $m_{\text{кмм}}$ — масса кожно-мускульного мешка, г.

Кроме того, при отборе производителей необходимо учитывать, что качество половых продуктов в пределах одной и той же акватории в разные годы также может существенно изменяться. Особенно это характерно для голотурий, обитающих в бухтах северного Приморья. Так, например, в бухте Киевка в 2006 и 2009 гг. размер большей части зрелых ооцитов (80 %) был меньше 140 мкм, что обусловило снижение выживаемости и скорости роста личинок и молоди. В связи с этим, необходимо учитывать размерную структуру половых клеток в гонадах производителей. Контроль состояния гонад осуществляется при проведении биологического анализа производителей с периодичностью 1 раз в неделю.

При проведении отлова зрелых производителей трепанга необходимо учитывать продолжительность нерестового периода в районе отлова. В северных районах нерестовый период длится не более двух недель. Вследствие этого возникновение любого сбоя в технологическом цикле культивирования оказывает сильное влияние на результаты работ всего года, так как времени для исправления ситуации не остается. Получение молоди трепанга можно осуществлять со второй декады июля по первую декаду августа. В южных районах зал. Петра Великого период отбора зрелых производителей в естественных условиях занимает около двух месяцев и в зависимости от типа года (холодный — теплый). Работы можно начинать со второй декады июня, когда половые продукты животных находятся на нерестовой стадии развития гонады, и до середины августа. В более поздние сроки зрелых производителей можно находить на больших глубинах, где в результате особенностей температурных условий процесс созревания половых продуктов замедляется и вследствие этого нерест животных сдвигается.

Для оценки качественных характеристик половых продуктов следует определить стадию зрелости гонады, размеры и количество пристеночных и сво-

боднолежащих ооцитов (при увеличении 8×7 — не менее 50 кл.). На нерестовой стадии половая железа самок заполнена свободнолежащими ооцитами, самцов — сперматозоидами. Если гонадный индекс у трепанга, обитающего в акваториях северного Приморья, достиг 6–10 %, а в зал. Петра Великого — 20–22 % и в половой железе количество свободнолежащих ооцитов размерами 140 мкм и более составляют не менее 30–50 %, можно проводить отлов производителей для стимуляции нереста в заводских условиях.

Производители трепанга весьма чувствительны к внешнему воздействию, особенно на нерестовой стадии. При отлове не допускается повреждения внешних покровов животных, контакта производителей трепанга с нефтепродуктами и другими загрязняющими веществами. Следует избегать излишнего механического воздействия, которое возможно при помещении большого количества животных в садок или питомзу. Во избежание эвисцерации (выброса внутренностей) животные должны доставляться на поверхность малыми партиями (по 10–20 экз.). Трепанги с выброшенными внутренностями непригодны для проведения нереста.

Сразу после подъема на поверхность трепанги должны помещаться в емкости с морской водой, температура которой близка к таковой в районе их отлова, и по возможности быстро доставлены в заводские условия. Нельзя допускать резких изменений температуры и попадания на емкости с производителями прямых солнечных лучей.

В случае если время перевозки животных от места отлова превышает 1–2 ч, необходимо обеспечить смену воды в сосудах (на 0,5–1,0 объема в час). Не следует перевозить производителей при большой плотности. В зависимости от времени, необходимого на доставку животных, плотность посадки их в бассейны (емкости) должна составлять от 0,1 до 0,5 экз./л воды.

Адаптация производителей

Отловленные производители перед началом стимуляции нереста должны пройти температурную адаптацию. Исходная температура воды в бассейнах для содержания производителей должна соответствовать донной температуре воды в море в месте их отлова. Продолжительность периода адаптации может составить от нескольких часов, если температура воды в момент отлова ниже нерестовых температур на 1–2 °С, до 2 сут — если температура воды в море ниже 10–12 °С. После периода адаптации температура воды в бассейнах с производителями повышается до нерестовых значений.

В период адаптации и последующего содержания производителей при нерестовых температурах следует обеспечивать благоприятные условия среды. Для содержания трепанга должны использоваться бассейны, изготовленные из нейтральных материалов: стекла, пищевого полиэтилена, капрона, поликарбоната, фторопласта или цемента, покрытого эмалью. Конструкция сосудов, которая используется в настоящее время в отделении нереста, вполне соответствует требованиям, предъявляемым для нормального обеспечения условий содержания производителей.

Плотность посадки животных не должна превышать 1 экз./10 л воды, проток должен составлять до 3 объемов в сутки. Насыщение воды кислородом должно поддерживаться на уровне 80–100 %. Ежедневно необходимо очищать емкости от экскрементов и грязи.

В процессе адаптации, а также на всех последующих этапах необходимо отслеживать состояние животных. В случае появления на поверхности тела голотурий каких-либо повреждений, изменения поведения или формы тела животные должны выбраковываться. Также выбраковка должна осуществляться при возникновении на кожно-мускульном мешке язв или появлении других признаков заболеваний. Кроме того, должны выбраковываться особи, у которых произошла эвисцерация внутренностей.

Стимуляция нереста трепанга

Так как у трепанга отсутствует половой диморфизм, визуально определить пол животных не представляется возможным. Количество производителей, подвергаемых стимуляции, определяется в зависимости от количества имеющихся емкостей для выращивания личинок.

Следует учитывать, что нерест, как правило, происходит не у всех голотурий одновременно, в некоторых случаях половые продукты выметывают лишь 10–20 % самок. Для того чтобы гарантированно получить зрелые яйцеклетки от нескольких самок, стимуляции одновременно должно быть подвергнуто не менее 30 голотурий. Нерест самцов в результате проведения стимуляции обычно проходит более массово, нерестятся от 50 до 100 % животных.

Плотность посадки животных при проведении стимуляции может достигать 0,2 экз./л воды при условии увеличения смены воды до 6 объемов в сутки (табл. 1).

Наиболее эффективным является метод температурной стимуляции нереста путем постепенного повышения температуры воды.

Нормативы выращивания трепанга для этапа стимуляции нереста

Показатель	Единица измерения	Качественная характеристика или величина
Отбор производителей в море	—	Июнь-август
Скорость водообмена	Объем/сут	6
Плотность посадки животных	Экз./л	0,2
Соленость	‰	Не ниже 25
Концентрация аммиака	Мг/л	Не выше 0,2–0,3
Скорость повышения температуры	°С/сут	1–2
Максимальная температура	°С	22
Насыщение воды кислородом	%	Не ниже 80
Оплодотворение	%	100

После окончания периода адаптации температуру воды следует постепенно, на 1–2 °С в сутки, повышать до 20–22 или 24–25 °С для производителей, отловленных соответственно в северных или южных районах. В дальнейшем она должна поддерживаться на этом уровне в течение всего процесса стимуляции. Колебания температуры воды более чем на 1–2 °С в сутки нежелательны, поэтому необходим ее постоянный контроль.

Необходимо постоянно наблюдать за состоянием производителей. На скорое наступление нереста указывает особое поведение животных, которое проявляется в неоднократном поднимании и вращательном движении передней части тела, ее раскачивании, набухании гонопора.

Метод температурной стимуляции нереста при необходимости может быть дополнен контрастной стимуляцией (подсушиванием и водяной струей), при которой производители в течение 40–60 мин выдерживаются на воздухе, а потом окатываются прохладной морской водой, после чего помещаются в емкости для нереста. Метод контрастной стимуляции не всегда обеспечивает ожидаемый результат и может привести к эвисцерации внутренностей трепанга, особенно когда он находится в нерестовом состоянии и особо чувствителен к механическим воздействиям. Производители трепанга, не приступившие к нересту после двух-трех стимуляций, должны отбраковываться.

Бионормативы для этапа стимуляции нереста приведены в табл. 1.

Получение и выращивание эмбрионов и личинок

Оплодотворение яйцеклеток и получение эмбрионов

Обычно нерест происходит в вечернее или ночное время. Как правило, первыми начинают нереститься самцы (рис. 3).



Рис. 3. Нерест самцов трепанга

Появление в сосудах спермы является дополнительным стимулом для нереста остальных животных. Поэтому для дополнительной стимуляции нереста может использоваться сперма из вскрытых самцов, добавляемая в воду.

Нерест самок может произойти в период времени от нескольких часов до нескольких суток. Если не удалось заметить момент начала вымета яйцеклеток, нерестящихся самок легко обнаружить по оранжевому пятну осевшей на дно икры (рис. 4).

После начала нереста самок желательно перенести в отдельный сосуд с чистой профильтрованной водой емкостью 20–30 л. Быстрый перенос животных в другой сосуд не прекращает их нереста.

Выделение половых продуктов длится 40–60 мин, а иногда и более, в зависимости от массы гонады и степени ее наполненности половыми клетками. Затем зрелые половые продукты самцов (10–15 мл взвеси спермы цвета разбавленного молока) добавляются в сосуд с самками.

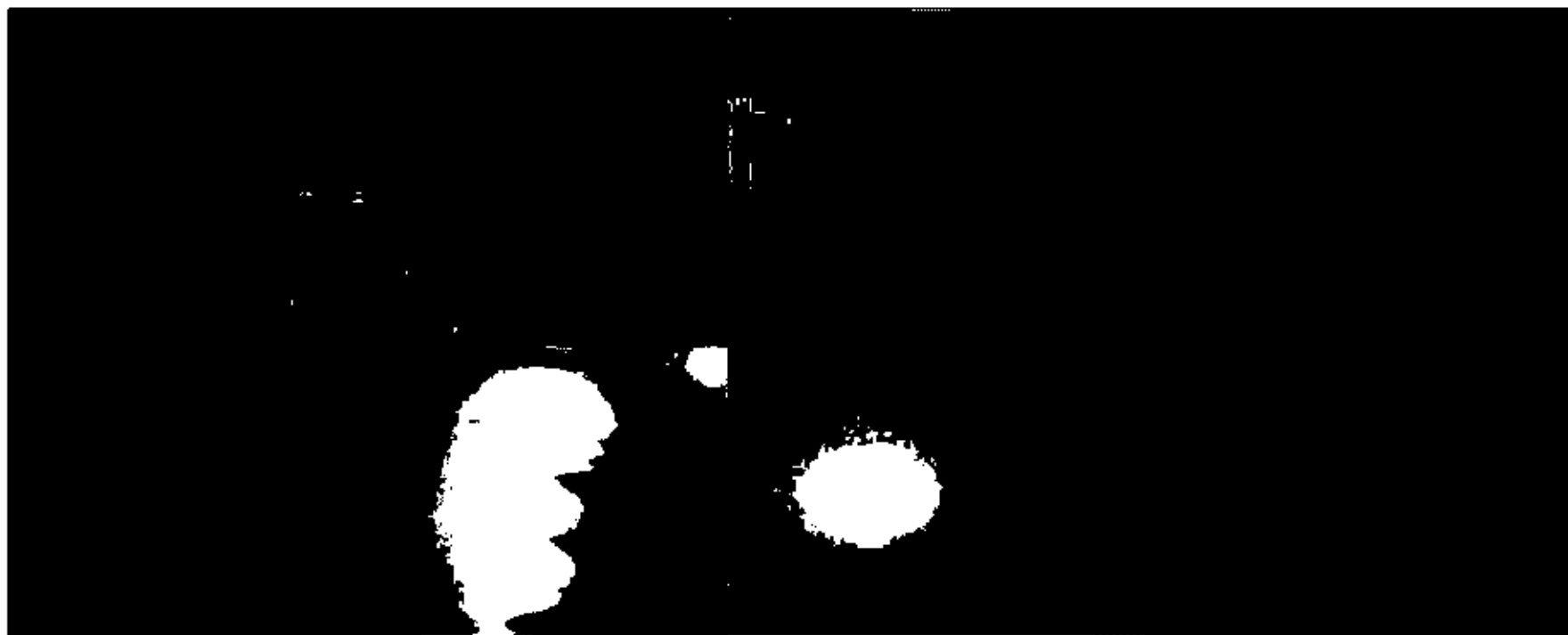


Рис. 4. Нерест самок трепанга

Если нерест трепанга полностью прошел в бассейнах, в которых осуществлялась стимуляция производителей, половые продукты можно собрать путем фильтрации воды из сосуда через капроновое сито с диаметром ячеей не более 100 мкм, сложенное в два слоя. Поток воды при этом должен быть небольшим, по мере накопления на сите яйцеклеток она смывается профильтрованной водой в 20–30-литровую емкость. Собранные половые продукты перед помещением в сосуды для их инкубации и выращивания личинок двукратно промываются на сите профильтрованной морской водой с целью удаления избытка спермы и других нежелательных включений.

Для подсчета половых клеток самок содержимое емкости хорошо перемешивается, после чего отбирается проба объемом 300–500 мл. Так как концентрация клеток в такой пробе, как правило, слишком велика для прямого подсчета, из этой пробы после повторного перемешивания отбирается вторая проба объемом 1–10 мл, которая разводится чистой морской водой в 10–100 раз (в зависимости от плотности). Под бинокуляром в камере Богорова подсчитывается количество клеток в 10 мл разведенной пробы. Подсчет повторяется 3–5 раз, затем рассчитывается среднее количество клеток в пробе. Для удобства подсчета количество клеток в камере не должно превышать 100 шт. На основании полученных данных рассчитывается общее количество полученных яйцеклеток.

Параллельно контролируется ход оплодотворения половых клеток. Оплодотворение яйцеклеток трепанга наружное, синхронное, моносpermное и про-

исходит сразу же после их вымета. После образования оболочки оплодотворенная яйцеклетка не меняет формы и сохраняет свои размеры. Как правило, за время проведения подсчета (30–40 мин) количество оплодотворенных яйцеклеток (образовавших перивителлиновую оболочку) достигает 100 %.

Эмбриональное развитие и условия инкубирования эмбрионов

Оплодотворенные яйцеклетки помещаются в сосуды, в которых осуществляется инкубация эмбрионов и в дальнейшем — выращивание личинок (рис. 5). Для инкубации икры и выращивания личинок необходимо использовать сосуды и оборудование, изготовленные из нейтральных материалов. Не допускается использование материалов содержащих медь, свинец, кадмий, мышьяк.



Рис. 5. Сосуд для инкубации эмбрионов и выращивания личинок

Плотность посадки икры составляет 1,1–1,2 экз./мл воды. Икра трепанга тяжелее воды, поэтому она оседает на дно сосуда. Для предотвращения кислородного голодания икры в процессе инкубации необходимо осуществлять механическое перемешивание и аэрирование воды. При аэрировании следует из-

бегать образования мощного потока мелких (диаметром 1–2 мм) пузырьков воздуха, который повреждает оболочки клеток. Смена воды в период эмбрионального развития не осуществляется.

Развивающиеся яйцеклетки очень чувствительны к колебаниям температуры, особенно в течение суток. Поскольку при инкубации смена воды не проводится, температурный режим должен поддерживаться путем стабилизации температуры воздуха в помещении с помощью кондиционеров или нагревательных приборов. Следует избегать воздействия на сосуды прямого солнечного света.

Развитие эмбрионов должно контролироваться не менее 2–3 раз в сутки.

Дробление равномерное, полное начинается через 60–70 мин после оплодотворения. Эмбрион стадии 8 бластомеров образуется через 135–150 мин с момента оплодотворения, а стадии 32 бластомера — спустя 210 мин. Через 10 ч после оплодотворения образуется бластула, имеющая округлую форму. Первоначально она находится внутри желточной оболочки. Через 1–2 ч у нее образуются реснички, она начинает вращаться внутри оболочки и вскоре (через 1–2 ч) выходит из нее. Реснички позволяют эмбриону этой стадии самостоятельно двигаться. Спустя 18–22 ч после оплодотворения у эмбриона формируется архентерон, средняя длина зародыша при этом равна 290 мкм. В процессе развития у эмбриона происходит образование мерцательных шнуров, конфигурация которых придает ему определенную форму — форму предличинки. На этом эмбриональный период развития заканчивается.

Характеристики условий инкубации икры представлены в табл. 2.

Таблица 2

Нормативы выращивания трепанга для этапа инкубации икры

Показатель	Единица измерения	Качественная характеристика или величина
Плотность посадки икры	Экз./л	1200–1300
Продолжительность инкубации	Ч	18–22
Система водоснабжения	—	Непроточная
Оптимальная температура	°С	20–23
Соленость	‰	Не ниже 25
Концентрация аммиака	Мг/л	Не более 0,2–0,3
Насыщение воды кислородом	%	80–100
Выживаемость	%	Не менее 95

Гибель икры в процессе эмбрионального развития незначительна. Количество аномально развивающихся эмбрионов не должно превышать 5 %. В противном случае, партию следует выбраковывать, так как в ходе дальнейшего развития большинство личинок, как правило, погибают.

Развитие личинок и условия их выращивания

Выращивание личинок трепанга осуществляется в тех же емкостях, в которых инкубируется икра. Плотность посадки личинок на ранних стадиях развития не должна превышать 1 экз./мл.

В ходе развития личинка последовательно проходит 6 стадий (рис. 6).

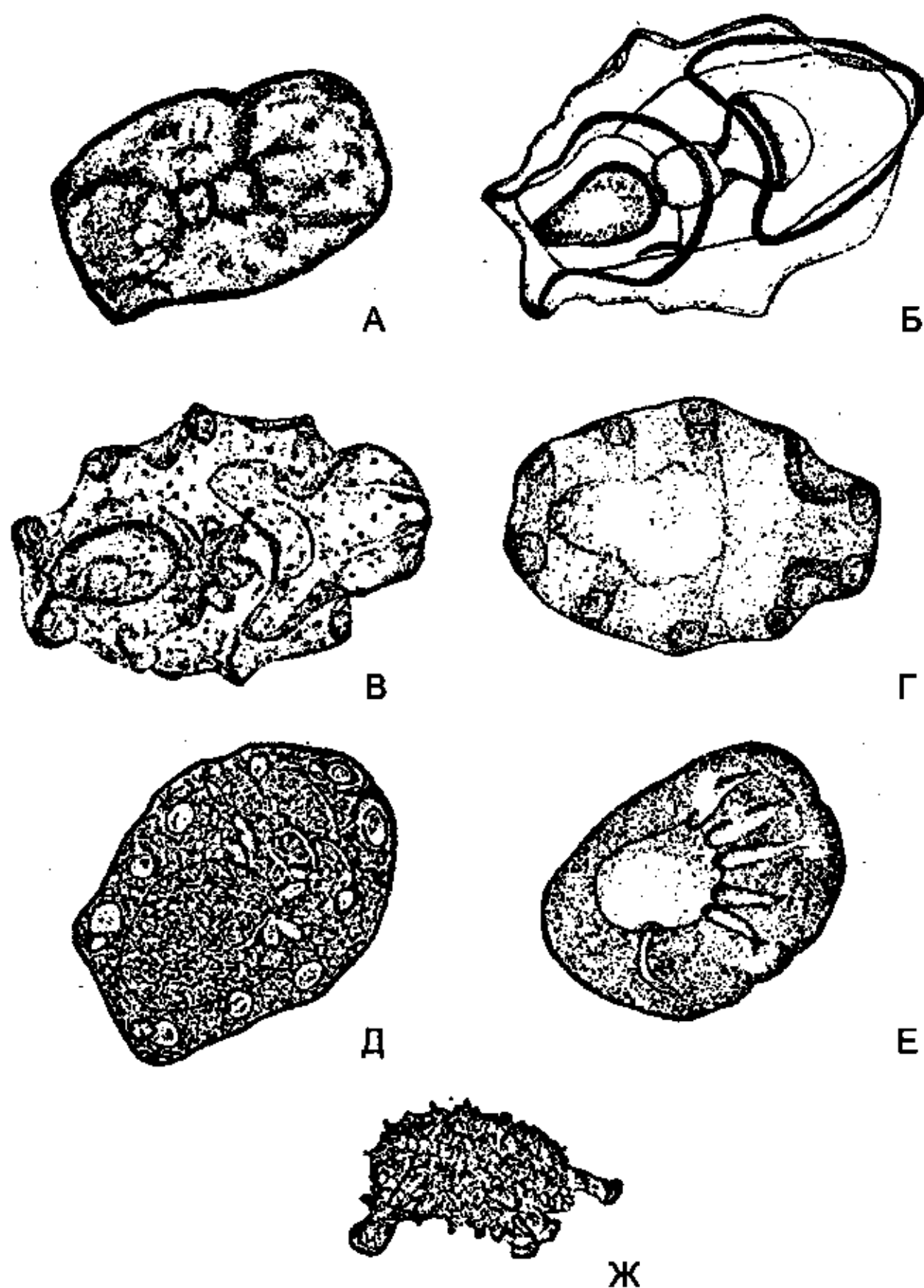


Рис. 6. Стадии личиночного развития дальневосточного трепанга (пояснения см. в тексте)

Предаурикулярия. Образуется через 20–30 ч после оплодотворения. Внешне прозрачна, имеет зачатки органов пищеварения. Длина личинок колеблется от 260 до 490 мкм. Продолжительность стадии — 24–30 ч, личинки не питаются (рис. 6, А).

Ранняя аурикулярия (рис. 6, Б). Формируется через 46–48 ч с момента нереста. Длина личинок составляет 450–480 мкм. На аборальном конце тела образуются две известковые пластинки. Органы пищеварения полностью сформированы, и личинки переходят на экзогенное питание. Внешним признаком начала готовности к потреблению пищи является сокращение глотки-пищевода. При нормальном развитии пищеварительной системы желудок личинки имеет эллипсоидную форму, стенки его тонкие, отчетливо видимые, в желудке всегда находится пища. В случае аномального развития стенки желудка утолщенные, грубые, форма его суженная в виде трубочки. Это является симптомом деструкции пищеварительной системы, которая приводит к гибели личинок.

Развитие личинок до формирования ранней аурикулярии включительно протекает синхронно. Как правило, продолжительность стадии до 7 сут. Вместе с тем при неблагоприятных условиях этот период может быть более продолжительным. При этом отмечается значительное количество личинок с отклонениями развития, размер их уменьшается до 500–560 мкм. В этих случаях партию следует выбраковать.

При температуре 20–23 °С на 5-е сут при нормальном развитии личинки достигают длины 700 мкм и более. Прирост длины их тела на данной стадии в норме составляет 50 мкм/сут.

Поздняя аурикулярия. У личинок появляются зачатки мерцательных поясов, гидроцель принимает подковообразную форму и образует пять выступов — зачатков окологротовых щупалец. Длина личинок 800–1320 мкм (рис. 6, В). В конце стадии поздней аурикулярии у личинок происходят существенные морфологические изменения. Они утрачивают окологротовую впадину, а мерцательный шнур принимает вид трех-четырех отдельных поперечных поясов.

Преддолиолярия. Переход на стадию несинхронный: первые экземпляры появляются на 7–9-е сут с момента нереста (4–6-е сут с момента перехода на стадию поздней аурикулярии), последние — на 10–15-е сут с момента нереста. У личинок отсутствуют аурикулы, форма тела близка к цилиндрической. Длина личинок 450–580 мкм (рис. 6, Г). Личинки не питаются. Продолжительность стадии около 2 сут. В период сложных морфологических перестроек происходит наибольшая гибель личинок. Отход может достигать 60 % и более.

Долиолярия. На 10–12-е сут с момента оплодотворения длина личинок равна 390–470 мкм. У них хорошо развиты мерцательные пояса красноватого цвета, с помощью которых они перемещаются в воде (рис. 6, Д), но в основном они держатся в придонном слое. Продолжительность этой стадии — до 2 сут.

Пентактула. В процессе развития долиолярия утрачивает мерцательные пояса и превращается в пентактулу. На этой стадии у личинок хорошо развиты

мерцательные облучки, пять околоротовых щупалец и одна амбулакральная ножка. Щупальцы и ножка на своих концах имеют присоски, дающие возможность передвигаться по субстрату. Размер личинок 360–450 мкм (рис. 6, Е). В основном ведут придонный образ жизни, но встречаются и в толще воды, способны прикрепляться к поверхностной пленке воды. Продолжительность стадии пентактула — 2–4 сут.

Несинхронность развития приводит к тому, что одновременно в сосуде могут находиться личинки разных стадий (табл. 3).

Таблица 3

Сроки развития трепанга на ранних этапах онтогенеза в условиях культивирования

Стадия	Время с момента нереста, сут																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Эмбриогенез, диплеврула	Х																	
Ранняя аурикулярия		Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х										
Поздняя аурикулярия				Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х							
Преддолиолярия							Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х					
Долиолярия									Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х			
Пентактула											Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х

Разброс сроков развития личинок в разных сосудах, и особенно полученных в результате разных нерестов, может быть значительным.

Осевшая молодь. В процессе дальнейшего развития личинки приобретают внешний вид сформировавшейся молодежи. У них формируются решетчатые пластинки скелета и спинные выросты — «шипики», изменяется окраска кожного покрова, ткани уплотняются, развивается кишечник. Длина их 450–500 мкм (рис. 6, Ж). Молодь ведет активный образ жизни.

Скорость роста и развития личинок трепанга, полученных от одних и тех же производителей и развивающихся в одних и тех же условиях, может сильно различаться, и метаморфоз у них наступает не одновременно. Так, первые экземпляры молодежи формируются на 11–12-е сут с момента нереста, в массовом количестве она оседает на 14–16-е сут, а последние экземпляры оседают на 20–23-е сут.

На протяжении всего периода выращивания личинок ход их развития необходимо контролировать. Для этого ежедневно в одно и то же время следует отбирать пробы из каждой емкости с личинками. Пробы отбираются стеклянной трубкой от поверхности до дна в нескольких точках емкости (не менее 5 повторностей). Перед отбором проб воду в емкостях необходимо тщательно

перемешать. Из каждой пробы в камере Богорова под бинокуляром необходимо просмотреть не менее трех выборок объемом 5 или 10 мл каждая (в зависимости от плотности посадки личинок). При этом необходимо определить наличие и численность уродливых форм. В случае когда их доля превышает 25 %, партию необходимо выбраковать.

С момента появления в сосудах долиолярий и пентакул и соответствующего уменьшения до 50 % численности аурикулярий личинки должны перемещаться в бассейны, где и происходят их дальнейшее развитие, оседание и формирование молоди. Вместе с тем не исключается возможность оставлять часть личинок в сосудах, где они выращивались с размещением в них мягких субстратов. Таким образом, при большой численности полученных личинок решается вопрос с дополнительными сосудами.

Для сохранения личинок в условиях проточного режима водоснабжения на сливной трубе должен быть надет «чулок», изготовленный из капронового сита с диаметром ячеей, равном 100–120 мкм (см. рис. 5). С переходом большинства личинок в стадию осевшей молоди необходимо произвести замену «чулка» на другой, с бóльшим размером ячеей — 300-500 мкм. В течение всего периода выращивания личинок и молоди необходимо осуществлять механическую чистку «чулка», в противном случае, сито забивается кормом, что может привести к переполнению сосудов. Проверку состояния сита необходимо осуществлять несколько раз в течение суток. Аналогичные устройства применяются при выращивании личинок в бассейнах для молоди.

Нормативы выращивания личинок в контролируемых условиях представлены в табл. 4.

Таблица 4

Нормативы для этапа выращивания личинок трепанга

Показатель	Единица измерения	Качественная характеристика или величина
Плотность посадки	Экз./мл	1
Скорость водообмена	Объем/сут	0,7–1,0
Продолжительность выращивания	Сут	11–22
Оптимальная температура	°С	20–23
Соленость	‰	Не ниже 25
Концентрация аммиака	Мг/л	Не более 0,2–0,3
Насыщение воды кислородом	%	80–100
Освещенность	Люкс	400 ± 50
Концентрация микроводорослей в емкостях с личинками	Тыс. кл./мл	25–100
Выживаемость	%	10–20

Температура поступающей в сосуды с личинками воды регулируется системой водоподготовки. Стабильность температуры в сосудах поддерживается также за счет температуры помещения. Контроль температуры воды в сосудах и в помещении должен осуществляться дважды в день, скорость ее изменения не должна превышать ± 1 °C/сут.

В районах, для которых в течение суток характерна нестабильность температуры воды в море, во избежание ее резких колебаний в емкостях с личинками она должна постоянно контролироваться. В случае отсутствия автоматической системы отключения подачи воды, при понижении температуры, проток может отключаться полностью на кратковременный период (на 5–7 ч), что в целом не соответствует нормативам культивирования трепанга в заводских условиях, но и не оказывает негативного влияния на выживаемость личинок. Вместе с тем желательно ввести в систему водоподготовки блок автоматического отключения подачи воды.

При выращивании личинок проток воды, обеспечивающий очистку ее от продуктов метаболизма и наименьшее вымывание микроводорослей, составляет 0,7–1,0 объема сосуда в сутки. На период подачи корма в сосуды, в течение 3 ч, проток воды должен отключаться, в противном случае, происходит вымывание корма из сосудов. При условии круглосуточного протока с двумя 3-часовыми перерывами на кормление необходимая скорость потока воды составляет 0,65–0,93 и 0,32–0,46 л/мин (соответственно для 1000 и 500-литровых емкостей), т.е. 1 л воды должен подаваться за 92–65 и 188–130 с.

Насыщение воды кислородом должно поддерживаться на уровне 80–100 %. Допускается аэрирование ее непосредственно в сосудах с личинками. Для этой цели следует использовать стеклянные трубки с диаметром отверстия равным 0,3–0,5 см. Чрезмерное аэрирование может вызвать так называемую «газовую болезнь».

Ежедневно необходимо осуществлять контроль pH среды, поскольку при pH ниже 6 или выше 9 жизнестойкость личинок снижается, их рост приостанавливается, следующая стадия развития может не наступить и личинки погибают.

При выращивании личинок не допускается содержание аммонийного азота в воде свыше 0,2–0,3 мг/л. Предельно допустимые концентрации металлов в воде: ртути — 0,0005 мг/л, кадмия — 0,0050, меди — 0,0100, алюминия — 0,0500, цинка — 0,1000 мг/л.

Трофические потребности и режим кормления личинок

Переход личинок на экзогенное питание при температуре 20–23 °С происходит через 2 сут после оплодотворения икры. С этого момента в сосуды необходимо вносить корм. Запоздывание с началом кормления более чем на сутки приводит к отставанию в развитии и гибели значительной части личинок.

В мировой практике культивирования трепанга для кормления личинок используются микроводоросли: *Dunaliella salina*, *Gymnodinium lanskaya*, *Chaetoceros muelleri*, *Nitzschia closterium*, *Phaeodactylum tricornutum*.

Количество корма и режим кормления при выращивании личинок трепанга представлены в табл. 5. В течение 3–5 дней личинкам необходимо давать микроводоросли с оболочками, легко разрушаемыми их ферментной системой. К ним относятся культуры микроводорослей *D. salina* и *Ch. muelleri*, которыми можно кормить либо в виде монокультур, либо в виде смеси в соотношении 1 : 1 (табл. 5).

Таблица 5

Состав и концентрация корма для личинок трепанга

Стадия развития личинок	Видовой состав микроводорослей	Концентрация микроводорослей в емкостях с личинками	Соотношение видов микроводорослей	Режим подачи корма
Ранняя аурикулярия	<i>Ch. muelleri</i> , <i>D. salina</i>	10 тыс. кл./мл воды	Один вид либо в соотношении 1 : 1	2–4 раза в сутки
Поздняя аурикулярия, долиолярия, пентактула	<i>Ch. muelleri</i> , <i>D. salina</i> , <i>Ph. tricornutum</i>		1 : 1 : 1 либо 2 : 1 : 2	

Начиная с третьего дня корм для личинок должен быть многокомпонентным. Наиболее подходящим кормом личинок в этот период служит смесь культур микроводорослей: *D. salina*, *Ch. Muelleri* — в соотношении согласно данным табл. 5. С периода завершения стадии ранняя аурикулярия в состав корма должен вводиться *Ph. tricornutum*.

Оптимальная концентрация клеток микроводорослей в сосудах с личинками при их кормлении составляет 10 тыс. кл./мл. Предельно допустимая концентрация клеток микроводорослей в воде — 100 тыс. кл./мл. При превышении этой концентрации происходит перезаполнение желудков и глоток личинок, что приводит к их гибели.

Показателем обеспеченности кормом личинок является наличие в желудках не менее 2–5 кл. микроводорослей, что определяется ежедневным просмотром их под бинокуляром.

При соблюдении режима кормления желудки личинок заполнены водорослями и имеют золотисто-коричневый цвет за счет содержимого перевариваемых клеток.

Кормление личинок необходимо осуществлять 2–4 раза в сутки. При внесении корма для предотвращения его вымывания проток воды должен отключаться на 3 ч.

В случае отсутствия по какой-либо причине необходимого количества микроводорослей, в качестве дополнительного корма можно использовать хлебные или морские дрожжи с размером клеток 5–10 мкм. Суспензию хлебных дрожжей получаем разведением сухих дрожжей в дистиллированной воде до концентрации 20 млн кл./мл. Концентрация клеток дрожжей в емкостях с личинками поддерживалась на уровне 20–50 тыс. кл./мл. Режим кормления личинок дрожжами такой же, как и при кормлении микроводорослями.

Осаждение личинок и выращивание молоди

Условия выращивания молоди. Состав и концентрация корма для молоди и режим ее кормления

К моменту переноса личинок в бассейны для осаждения и выращивания молоди в них должны быть установлены субстраты. В качестве субстратов могут быть использованы пластиковые гофрированные пластины в кассетах или безузловая многонитчатая дель (рис. 7, 8). Так как значительная часть личинок оседает на дно емкостей, его также необходимо застилать мягким субстратом.

После окончания оседания личинок на размещенные на дне мягкие субстраты их необходимо переносить в другие бассейны, поскольку на дне создаются неблагоприятные условия для развития полученной молоди.

На этапе выращивания молоди трепанга используется проточный режим водоснабжения. При температуре воды 15–20 °С и нормативной плотности посадки животных смена 1 объема воды в сутки обеспечивает очистку сосудов от продуктов метаболизма. Насыщение воды кислородом должно быть не ниже 80 %, содержание аммонийного азота — не более 0,2–0,3 мг/л (табл. 6).

На первой стадии развития осевшей молоди в качестве корма необходимо использовать мелкодисперсный гомогенат макрофитов: цистозира (*Cystoseira crassipes*) и саргассум (*Sargassum* sp.), который равномерно осаждается на субстраты. Плотность корма на субстрате должна быть не менее 0,03 мг/см², тол-

щина его слоя — не более 1 мм. В противном случае, молодь как бы «утопает» в нем и его потребление снижается.



Рис. 7. Гофрированные пластины с молодью трепанга

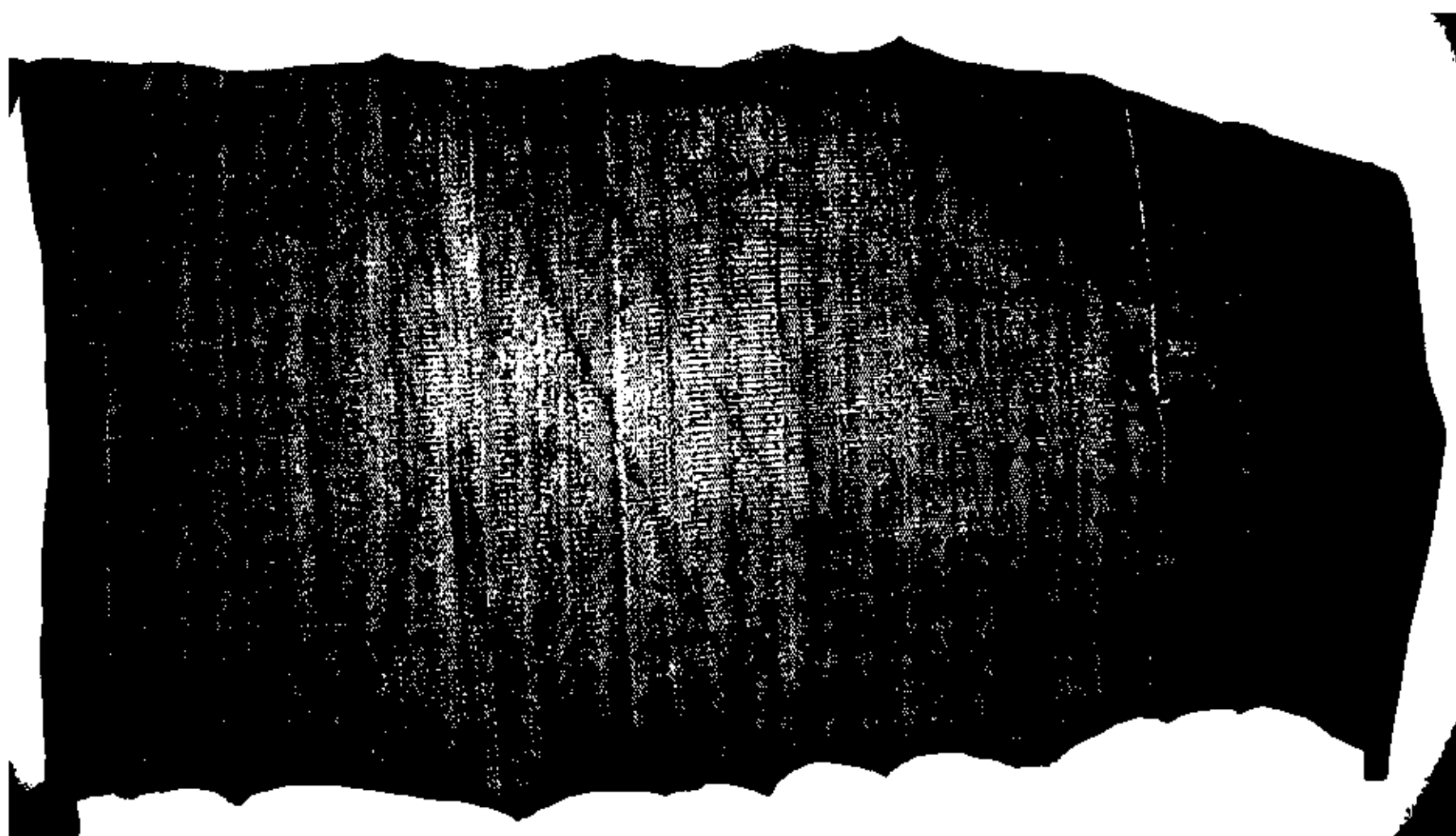


Рис. 8. Мягкий субстрат — безузловая многонитчатая дель

Нормативы этапа выращивания молоди трепанга

Показатель	Единица измерения	Качественная характеристика или величина
Температура воды	°С	15–20
Соленость воды	‰	Не ниже 25
Плотность посадки молоди размером до 0,4–0,6 см	Экз./пластину*	150–170
	Экз./м ²	500–700
	Тыс. экз./т воды	20–25
Плотность посадки молоди размером 1 см и более	Экз./пластину*	60–100
	Экз./м ²	200–340
	Тыс. экз./т воды	10–15
рН среды	–	8,0–8,3
Насыщение воды кислородом	%	100
Скорость протока	Объем/сут	1
Выживаемость	%	80
Аммонийный азот	Мг/л	Не более 0,2–0,3

* Пластины площадью 0,3 м².

Потребность в корме возрастает по мере роста молоди. Для молоди с длиной тела до 2 мм корм подается в сосуды из расчета 25–30 г гомогената на субстраты общей площадью 80 м². При длине тела молоди 2–4 мм ежедневная подача возрастает до 50 г; при длине тела молоди свыше 5 мм по мере роста ежедневное количество корма постепенно увеличивается до 100 г.

При достижении длины молоди трепанга более 6–8 мм в качестве корма используются детрит или комбикорма.

Детрит можно заготавливать путем сбора на специальные коллекторы-седиментаторы (ловушки детрита) в районах, где идут активные процессы осадкообразования, либо в районах подвесных плантаций культивируемых моллюсков. При этом необходимо учитывать кормовую ценность собранного детрита. Качественный состав органических веществ (ОВ) мягких осадков в целом характеризуется достаточно стабильным преобладанием негидролизуемого остатка ОВ, как наиболее устойчивой к минерализации части гумуса, над концентрациями гуминовых и фульвовых кислот. В то же время именно последние являются легкорастворимыми фракциями, потенциально биодоступными для детритофагов (Гальшева и др., 2008). Собранный корм можно заготавливать впрок, для этого его необходимо высушивать при температуре 70 °С и хранить в герметичной упаковке.

Специализированные комбикорма для выращивания молоди трепанга разработаны за рубежом. В нашей стране они также прошли испытания и показали хорошие результаты.

Комбикорма перед подачей необходимо предварительно замачивать в морской воде. Во время подачи корма его следует тщательно перемешать и затем через сито с размером ячеей 100 мкм равномерно распределить по всей поверхности выростного сосуда. Для более равномерного распределения корма при его подаче необходимо слегка перемешивать верхний слой воды в бассейне.

При кормлении молоди проток воды в бассейнах и ее аэрирование прекращается на 1,0–1,5 ч. Делается это для того, чтобы большая часть корма успевала осесть на поверхности субстратов и не вымывалась потоком воды.

Освещение в цехе должно быть минимально возможное для выполнения производственных операций.

При выращивании молоди большое значение имеет доступность корма. На стандартные кассеты с гофрированными пластинами в среднем оседает 18 % от вносимого в бассейны корма, который и является доступным для молоди. Большая его часть (80 % и более) осаждается на дно сосудов, и незначительная — на стенки. На одну пластину оседает порядка 0,15 г корма, или 0,05 мг/см². Данная концентрация корма обеспечивает нормальное развитие и рост молоди размером до 1 см и весом до 30–50 мг при плотности животных 160–170 экз./пластину (530–550 экз./м²).

При достижении 10–15 % особей размера 1 см и выше плотность корма необходимо увеличивать до 0,075 мг/см². Когда 70–80 % молоди достигают размера свыше 1 см плотность корма на пластине следует довести до 0,1 мг/см². Указанные концентрации корма обеспечивают нормальное развитие и рост молоди при плотности на одну пластину не более 100 экз., или порядка 330 экз./м².

Нормативные показатели кормления молоди трепанга приведены в табл. 7.

Таблица 7

Состав корма, его количество и режим кормления молоди трепанга

Размер молоди	Вид корма	Концентрация корма, мг/см ²	Режим подачи корма
До 0,5 см	Гомогенаты макрофитов	Толщина слоя не более 1 мм	Один раз в сутки
0,6–0,8 см	Комбикорм	0,05–0,07	
Свыше 1 см		0,1	Два раза в сутки

Следует учитывать, что осевший на пластины корм в течение суток выедается не полностью, поэтому регулярно вносимое его количество должно корректироваться. Для оценки количества корма субстраты необходимо ежедневно осматривать и только в случае 70–80 % его потребления можно вносить в сосуды новую порцию. По опыту работ в НПЦМ «Заповедное» в бассейны с субстратами общей площадью 80 м² комбикорм следует вносить от 30 до 100 г/сут. С уче-

том увеличения рационов молоди в процессе выращивания расход корма в сутки может возрасть в 2 раза.

За весь период выращивания 1 млн экз. молоди трепанга потребуется порядка 200–250 кг комбикорма.

При использовании мягких субстратов расход корма гораздо ниже, чем в варианте с твердыми субстратами, поскольку на них концентрируется до 40–50 % и, таким образом, на единицу площади оседает порядка 0,7–1,0 мг/см². Показатели размеров молоди, растущей на жестком и мягком субстратах приведены на рис. 9. Доля пигментированных особей на мягких субстратах также выше.

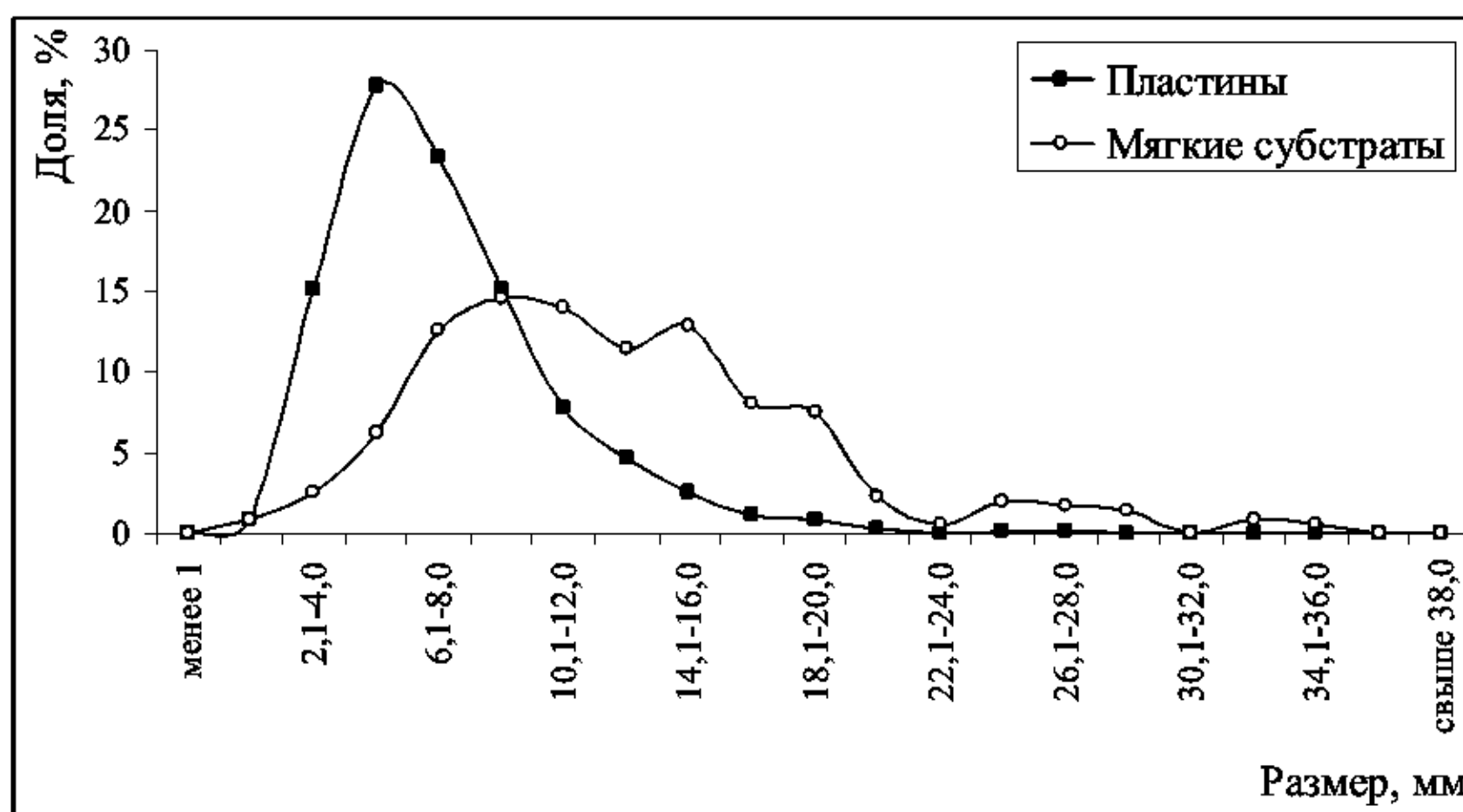


Рис. 9. Размерные структуры молоди трепанга, выращиваемой на мягких субстратах и гофрированных пластинах

Накопившийся на дне бассейнов корм при температуре выращивания молоди (20 °С) довольно быстро разрушается, что приводит к загрязнению воды. Поэтому необходимо следить за состоянием дна бассейнов и своевременно очищать его. Как показывает практика, чистку дна необходимо проводить не реже одного раза в два дня.

При культивировании трепанга в заводских условиях необходимо определять размер и численность выращиваемой молоди.

Численность молоди определяется путем подсчета на 6–10 случайно выбранных пластинах из каждого бассейна, на дне, стенках и мягких субстратах — с помощью рамок площадью 10 х 10 и 25 х 25 см.

Недопустимо выращивать молодь с плотностью 500 экз./пластину и более даже в течение 5–7 сут с момента оседания. В случае высоких концентраций ее необходимо разреживать. Запоздывание с уменьшением плотностей посадки

негативно сказывается на дальнейшем развитии и росте молоди, несмотря на принимаемые после истечения указанного срока меры по уменьшению плотности посадки. Отставание в росте молоди может составлять 2–3 раза.

Наиболее приемлемым методом для оценки размерной структуры является ее фотографирование. Для этой цели животные смываются с пластин или мягких субстратов и помещаются в кювету с водой, где через некоторое время они приобретают естественную форму тела. Молодь в кювете фотографируется с расстояния около 1 м вместе с объектом, имеющим известный размер. После этого по полученным цифровым фотографиям определяется ее длина (например, при помощи программы Adobe Photoshop) (рис. 10).

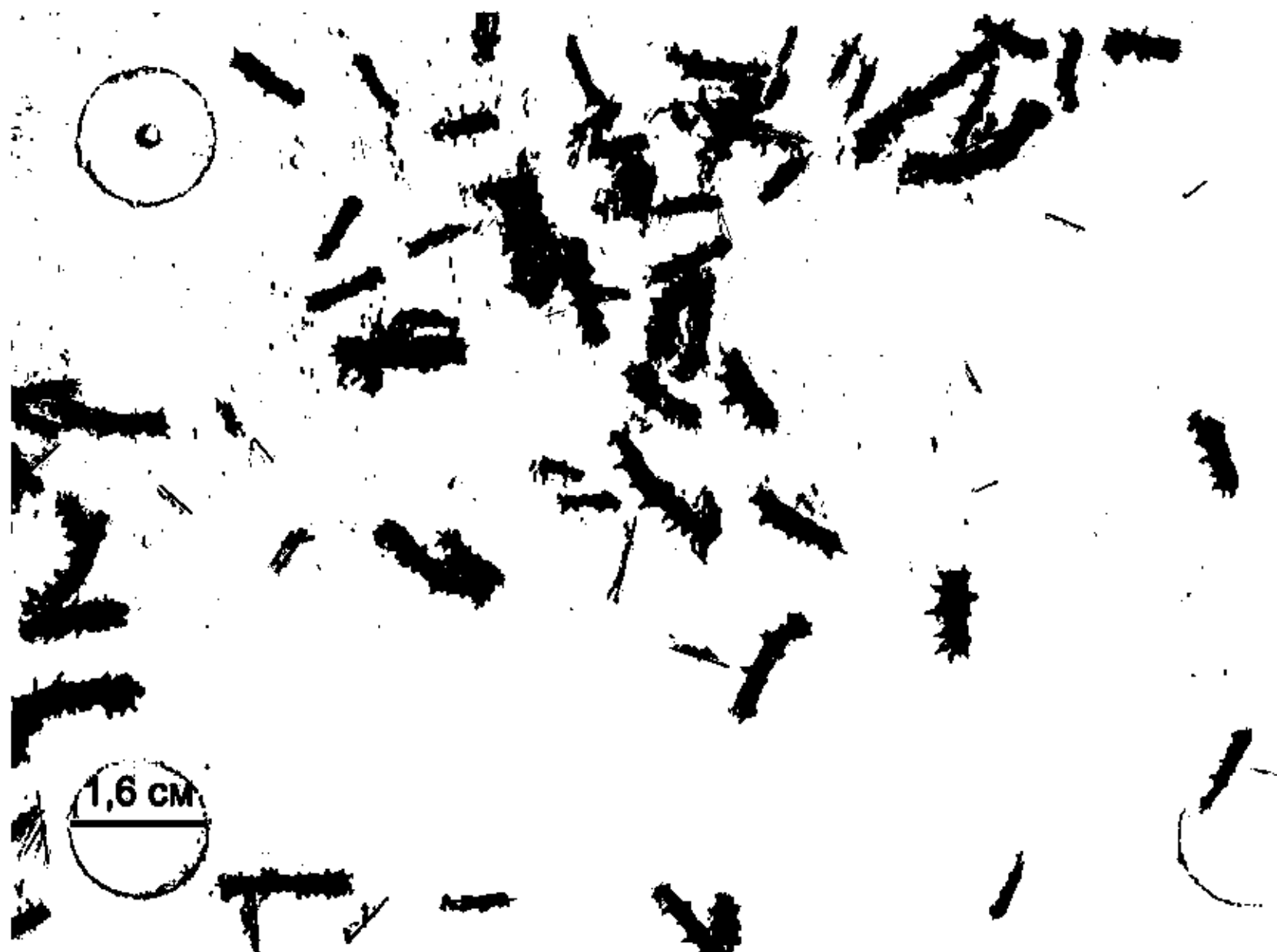


Рис. 10. Измерение длины молоди трепанга по фотографии

Использование этого метода позволяет повысить точность измерений и уменьшить испытываемый молодью стресс.

Адаптация молоди к условиям района расселения

Расселение трепанга проводится, когда размеры молоди в заводских условиях достигают 1,5–3,0 см. В зависимости от гидрологических условий района расселения это происходит в октябре — начале ноября.

Перед расселением проводится адаптация молоди к температурным условиям района обитания. В зависимости от придонной температуры воды на участке расселения трепанга определяются период адаптации животных и скорость понижения температуры. Как правило, в период расселения молоди температура воды на дне составляет 5–10 °С.

Температура воды при выращивании молоди в заводских условиях составляет около 20 °С.

Наиболее приемлемым способом адаптации животных к указанной температуре является «ступенчатый». На первом этапе температуру воды в бассейнах с трепангом следует понижать на 1–2 °С в сутки, доводя ее до 10–15 °С, после чего на втором этапе скорость понижения температуры можно увеличить до 3–5 °С в сутки.

Адаптированная к температуре района расселения молодь с помощью широких мягких кистей смывается с субстратов в те же сосуды, в которых осуществлялось выращивание. В этом сосуде мальки могут содержаться на протяжении 3–5 сут. Скорость протока воды в бассейнах, в которых сконцентрирована молодь, должна быть увеличена до 4–5 объемов в сутки.

Затем осевшая на дно и стенки молодь смывается потоком воды через нижнее отверстие бассейнов на сито с размером ячеей 0,5–1,0 мм и концентрируется в одной или нескольких емкостях (рис. 11).

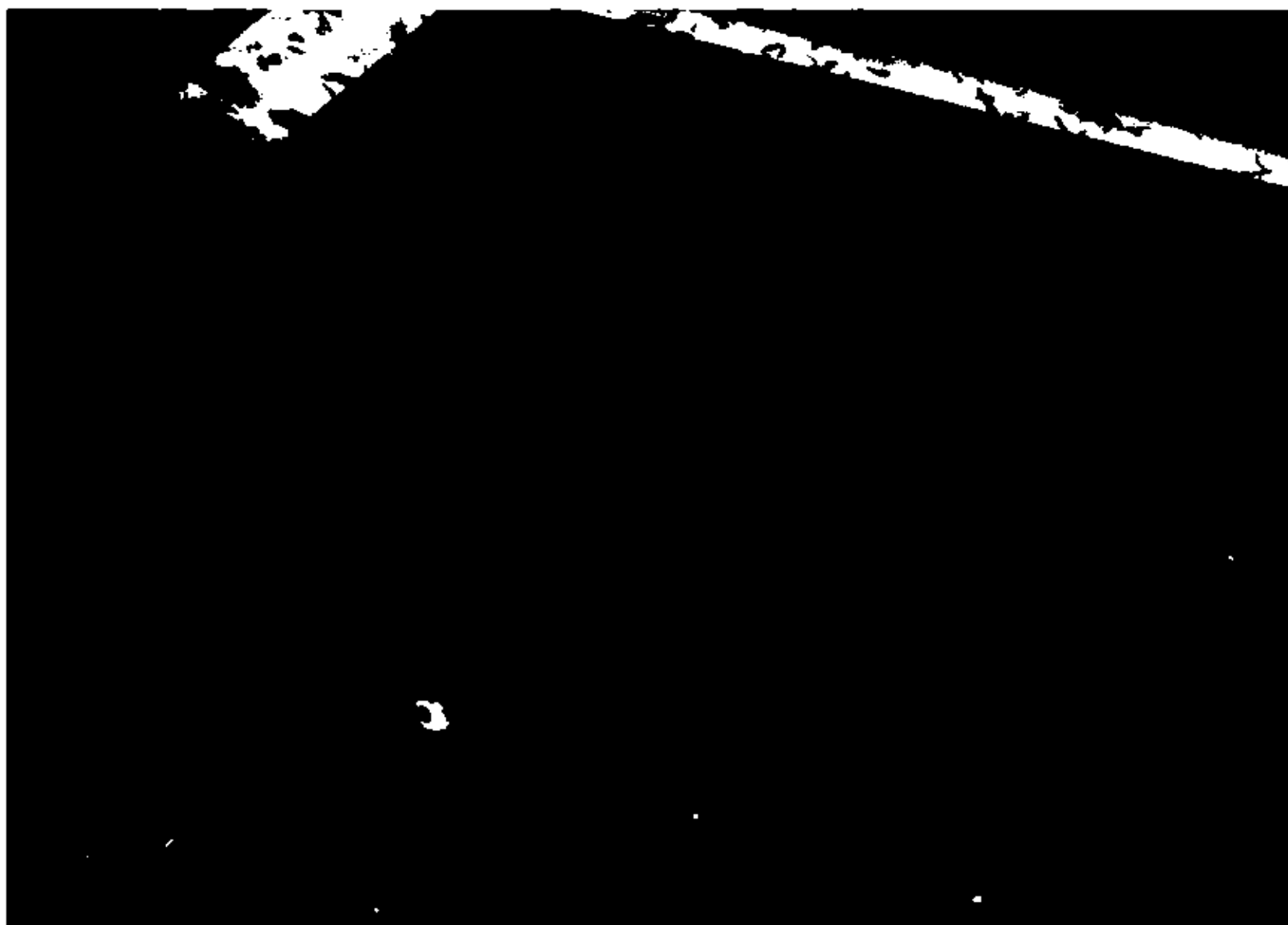


Рис. 11. Молодь трепанга, сконцентрированная в бассейне перед расселением

Плотность посадки молоди при температуре воды 10 °С и менее не должна превышать 75–100 тыс./м³ (5 кг живого веса на 1 м³). При более высокой температуре воды плотность посадки должна быть уменьшена.

Время нахождения молоди в емкостях при указанных параметрах должно составлять не более 3–4 сут.

Непосредственно перед перевозкой к месту расселения молодь смывается через сливное отверстие сосуда и концентрируется. Затем вся партия молоди взвешивается, из нее отбирается не менее трех выборок, в которых определяется количество и средняя масса животных. Полученные данные пересчитываются на общий вес молоди. Затем мальки трепанга помещаются на мягкие субстраты площадью 1,5–2,0 м² в количестве 3–5 тыс. экз. на субстрат. Субстраты с молодью размещаются в сосудах с морской водой (3–4 субстрата на 50-литровый сосуд), в которых осуществляется ее доставка к месту расселения. Максимальная допустимая плотность посадки молоди составляет 20 г/л (1 кг/50 л), или 100–200 экз./л (5–10 тыс. экз./50 л).

ГЛАВА 3. БОЛЕЗНИ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ТРЕПАНГА НА РАННИХ СТАДИЯХ ОНТОГЕНЕЗА. МОНИТОРИНГ ЗАБОЛЕВАНИЙ, МЕРЫ ИХ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И БОРЬБЫ С НИМИ

Значительную проблему при культивировании беспозвоночных представляют болезни, которые могут возникать на всех стадиях развития. Следствием их возникновения может быть резкое уменьшение численности и скорости роста личинок и молоди трепанга, в отдельных случаях 100 %-ная гибель, что приводит к значительным экономическим потерям.

Причинами возникновения болезней может быть заражение вирусами, патогенными бактериями, простейшими или паразитическими организмами. Вызывать заболевания или способствовать их развитию могут также плохие условия культивирования, например, избыточное аэрирование или неподходящая температура, что приводит к гибели, например, личинок трепанга (Hamel et al., 2001; Wang et al., 2004).

До настоящего времени заболевания трепанга мало изучены. Ниже перечислены симптомы наиболее распространенных и опасных заболеваний трепанга на разных стадиях культивирования.

Болезни личинок

У личинок на стадии аурикулярия отмечается разрушение оболочки тела («гниение»). Симптомом заболевания является видимое потемнение оболочки, после чего начинается ее разрушение и в течение 2 сут личинка лизируется (рис. 12). Смертность при заболевании составляет около 90 %. В случае если личинка перенесла это заболевание, жизнестойкость ее при дальнейшем развитии и метаморфозе очень низка. Возможным возбудителем заболевания являются грамотрицательные бактерии (предположительно рода *Vibrio*).

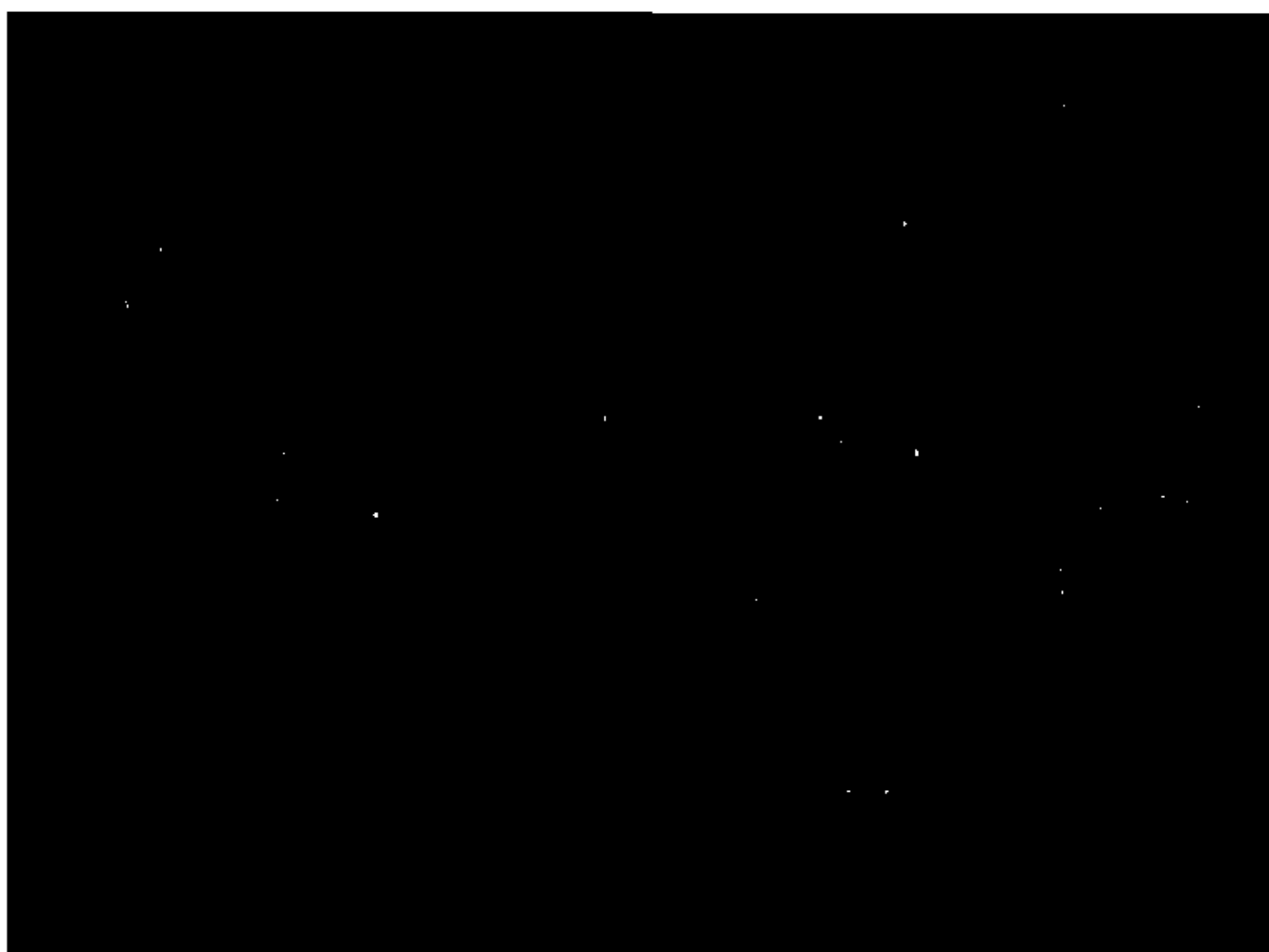


Рис. 12. Разрушение оболочки тела личинки трепанга: а — начальная стадия заболевания; б — разрушение тела личинки

При неблагоприятных условиях содержания (высокой температуре, большой плотности личинок, недостатке пищи или использовании таких кормов, как хризифиты или *Platymonas* sp.), у личинок отмечается поражение желудка. Симптомом заболевания является утолщение и огрубление стенок желудка, на поздних стадиях — атрофия (Liu et al., 2002). Наиболее подвержены данному заболеванию личинки на стадии аурикулярии. Гибель зараженных личинок достигает 90 % (в основном она происходит во время перехода на стадию долиолярии). Болезнь вызывается патогенными бактериями. Мерой профилактики болезни является соблюдение технологии кормления. Для борьбы с болезнью могут быть использованы антибиотики (пенициллин и стрептомицин в концентрации 3–5 мг/л).

У личинок стадии аурикулярия в конце июля — августе отмечается заболевание, внешним симптомом которого является окрашивание тела личинок в розовый цвет (рис. 13, а) с последующим полным разрушением внутренней структуры (рис. 13, б).

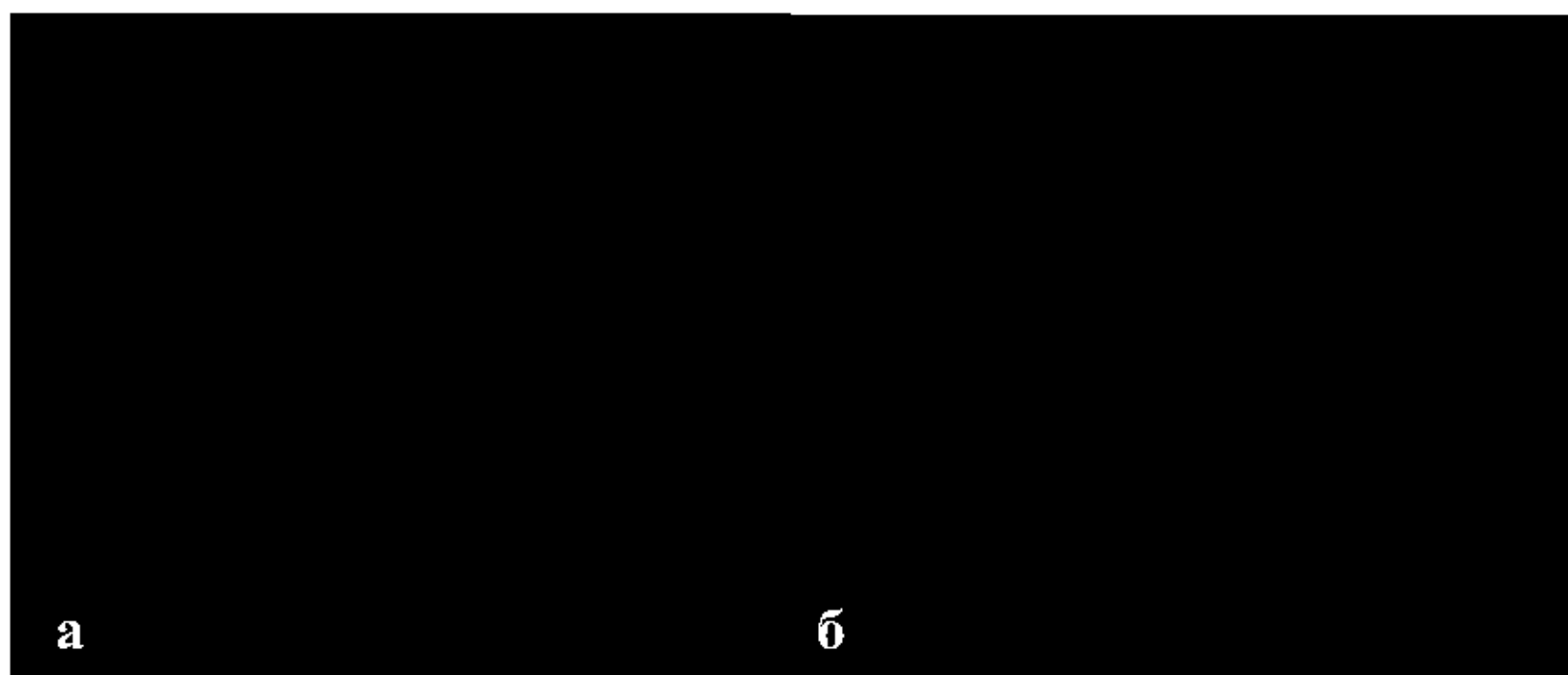


Рис. 13. Симптомы «розовой болезни»: а — больная личинка; б — состояние внутренней структуры погибших личинок

Время развития заболевания от нескольких часов до 1–2 сут. Смертность достигает 100 %. Погибающие личинки скапливаются на дне сосудов. При этом места их концентрации окрашиваются розовым цветом, который сохраняется в течение нескольких часов. Возбудитель заболевания не установлен. В некоторых случаях эффективным для лечения оказывается применение препарата «Антибак-500» (производитель НВЦ ООО «Агроветзащита», Россия), широко используемый в лечебно-профилактических целях в рыбоводных хозяйствах.

В условиях чрезмерного аэрирования воды в сосудах с личинками возможно возникновение «газовой болезни». Ее симптомом является наличие в стомадеуме, глотке и желудочке газовых пузырьков, что приводит к анорексии личинок. При незначительном попадании пузырьков газа во внутренние органы личинок смертность невелика, в тяжелых случаях болезнь вызывает массовую гибель личинок.

Заболевания молоди и производителей

У ранней молоди, выращиваемой на твердых субстратах (пластины из ПВХ), отмечен «синдром опадания с субстрата». Пораженные мальки уменьшаются в размерах, становятся малоактивными и постепенно теряют способность удерживаться на субстрате, в дальнейшем происходит разрушение их эпидермиса (рис. 14). Время развития болезни — 1–2 сут. Смертность достигает

80–100 %. Возможным возбудителем являются 3 группы грамотрицательных бактерий, две из которых предположительно относятся к роду *Vibrio*.

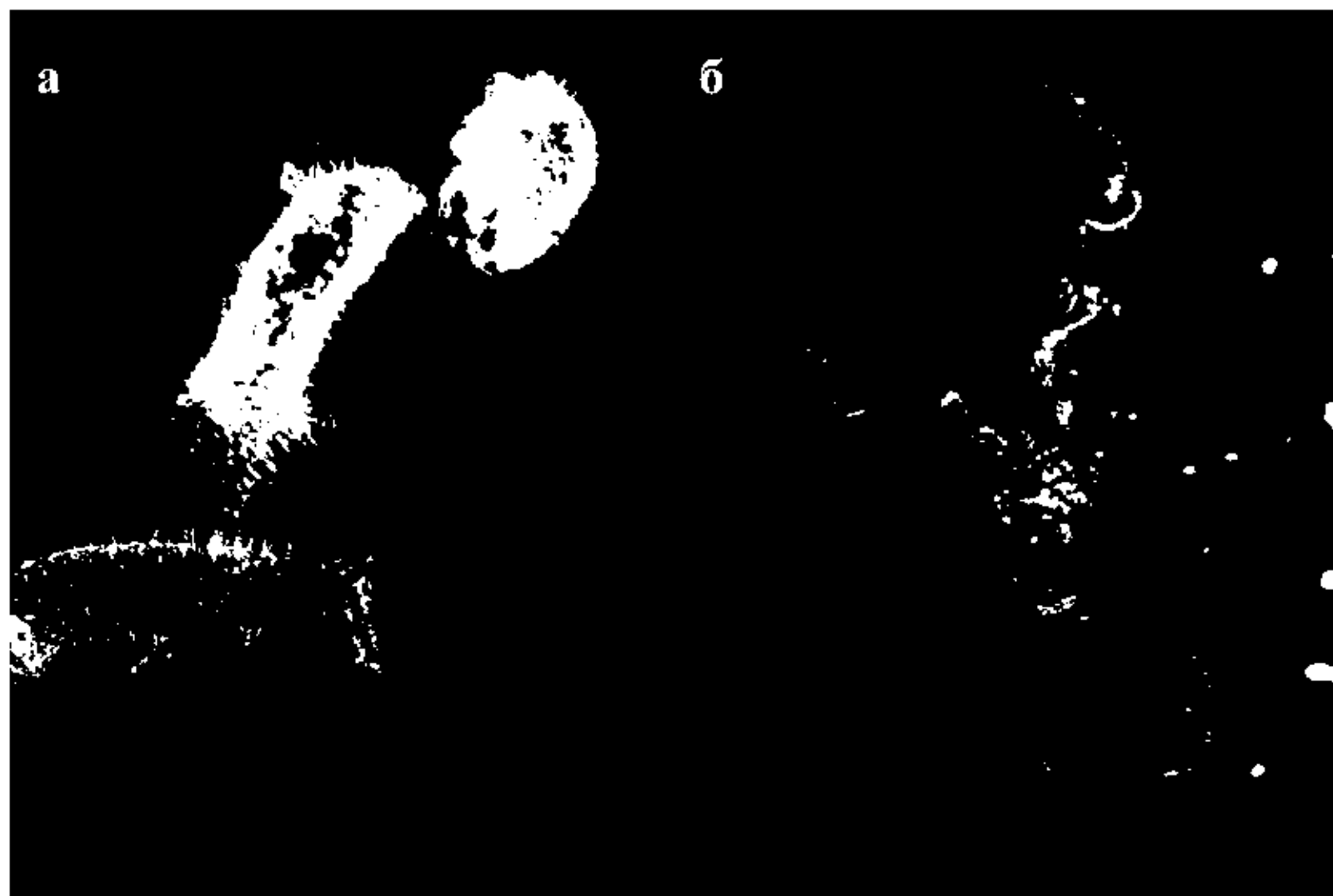


Рис. 14. Молодь трепанга на начальной (а) и конечной (б) стадии заболевания

В летний период при высоких температурах и при высокой плотности у молоди отмечаются язвы эпидермиса. Заболевание быстро распространяется, вызывая эпизоотии. Смертность достигает 100 %. Зараженные трепанги малоактивны, не питаются; тело сокращается, его форма становится округлой. На теле появляются небольшие белые язвы, которые в дальнейшем увеличиваются и поражают мускулатуру. Мертвые особи, опадая с субстрата, оставляют на нем отчетливо видимые белые пятна. Некоторые авторы полагают, что возбудителем является бактерия, образующая красные, розовые или бордовые пятна на ПВХ-пластинах (Zhang, Liu, 1998). Вид бактерии не определен. Профилактикой болезни является дезинфекция используемого оборудования и воды, своевременное удаление остатков корма. Для лечения могут использоваться антибиотики тетрациклин, ахеомицин (концентрация 3–5 мг/л) и сульфаниламиды.

Бактериальный язвенный синдром (bacterial ulceration syndrome, BUS) является одним из наиболее опасных заболеваний, поражающих как молодь, так и взрослые особи трепанга. Заболевание отмечено как в природе, так и в контролируемых условиях. На начальном этапе голотурии становятся малоактивными, в дальнейшем форма тела становится округлой, на верхушках шипиков и других участках тела появляются язвы (рис. 15, а). Пораженные участки тела имеют серо-голубую окраску, покрыты слоем белесой слизи. По мере развития яз-

вы могут покрыть значительную часть поверхности тела, а также привести к образованию сквозных отверстий (рис. 15, б).



Рис. 15. Симптомы бактериального язвенного синдрома: а — небольшие язвы и характерная форма тела; б — внутренние органы, вывалившиеся наружу через сквозную язву

В зависимости от температуры воды, состояния и размеров трепанга продолжительность болезни может составлять от 1–2 до 15 сут. За 2 дня может быть заражено 2/3 молоди в емкости.

Определение возбудителя является очень сложной задачей. Предположительным возбудителем язвенной болезни считаются 2 вида грамотрицательных бактерий (KL-1 и KL-2) (Wang et al., 2004), по данным других исследователей это заболевание может вызываться также вирусом размером 75–200 нм (Huan et al., 2008). Смертность при заражении бактериями составляет 20–30 %, при заражении вирусом — 90–100 %. Eeckhaut с соавторами (2004) выделил из язв три вида бактерий — *Vibrio* sp., *Bacteroides* sp. и α -proteobacterium. Из них наиболее вероятным возбудителем является вибрио. При заражении *Vibrio harveyi* смертность голотурий достигает 95 % (Morgan, 2000). В некоторых случаях больные животные заражаются также паразитическими нематодами.

Многообразие возможных возбудителей является вероятной причиной значительного различия скорости развития заболевания и вызываемой им смертности. Использование антибиотиков для лечения заболевания не во всех случаях дает устойчивый эффект.

Грибковые заболевания возникают в период с апреля по август. Поражаются молодь и взрослые животные. Симптомом заболевания является голубоватый оттенок поверхности тела, эпидермис разрушается грибом, появляются язвы (рис. 16). Иногда кожные покровы обесцвечиваются и становятся прозрачными. Стенки тела истончаются, у зараженной особи возникает отек. В отличие от BUS, нет выделения слизи.



Рис. 16. Грибковое заболевание

Эпизоотий, вызываемых простейшими, не отмечено, но в литературе описано заражение голотурий разных видов такими простейшими, как грегарины (родов *Cystobia*, *Diplodina*, *Goniospora*, *Lithocystis* и *Urospora*), и кокцидиями. По сравнению со здоровыми особями, пораженные животные слабы и пассивны. Видимых поражений на теле нет, но животные в некоторых случаях могут выбросить внутренности. Болезнь вызывается относительно крупными простейшими (около 70 мкм).

Проявления заболеваний, вызванных гельминтами, представлено на рис. 17. Во всех случаях оно приводит к высокой смертности (более 90 %) в течение месяца. Зараженная молодежь слабая, не питается, легко спадает с субстрата, тело ослизняется, внутренние органы часто выбрасываются. Гельминты вызывают сильные повреждения кожи. Вокруг ротового и анального отверстий образуются язвы, которые впоследствии распространяются по всему телу (Wang et al., 2004).



Рис. 17. Проявление паразитического заболевания, вызванного гельминтами

В некоторых случаях представители рода *Stichopus* могут заражаться паразитическими червями, обитающими в полостях тела, но эпизоотий многоклеточные паразиты не вызывают.

Для контроля состояния культивируемой молоди из нескольких точек бассейна случайным образом отбираются животные, и каждая отобранная особь осматривается под биноклем на предмет повреждений ротового и анального отверстий, папилл, цвета тела, выделения избыточной слизи, незаживающих ран, наличия паразитов. Животные с признаками стресса, измененным цветом эпидермиса или малоподвижные признаются нездоровыми, а с видимыми повреждениями и язвами (кроме заживших ран) — больными. В случае если более 5 % животных являются нездоровыми или более 2 % больными, вся партия, из которой бралась выборка, признается непригодной для дальнейшего выращивания или расселения.

Помимо различных заболеваний большой вред при культивировании трепанга может наносить размножение в емкостях вредных организмов. Для только что осевшей молоди опасны копеподы, в частности рода *Microsetella*. Пик размножения копепод совпадает с периодом оседания личинок трепанга (рис. 18). Копеподы травмируют кожный покров мальков, что ослабляет их и приводит к гибели. Для пигментированной молоди копеподы являются пищевыми конкурентами. Для уничтожения копепод могут быть использованы такие инсектициды, как хлорофос (концентрация 3 мг/л, время обработки 2 ч).

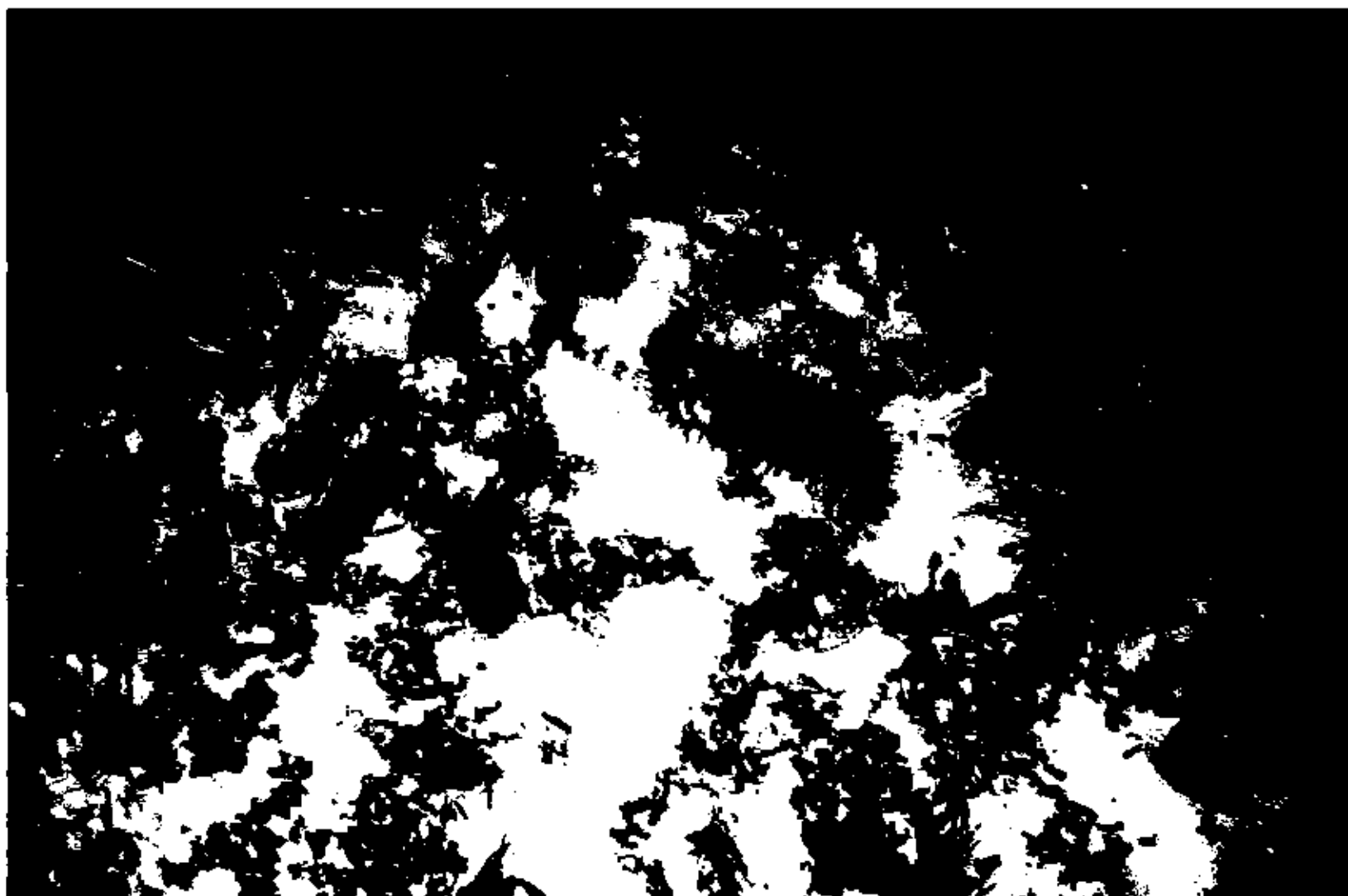


Рис. 18. Копеподы из сосуда с молодью трепанга

ГЛАВА 4. САНИТАРНАЯ ОБРАБОТКА ПОМЕЩЕНИЙ И ОБОРУДОВАНИЯ И ПРОВЕДЕНИЕ ПРОТИВОЭПИЗООТИЧЕСКИХ МЕРОПРИЯТИЙ

На предприятии по получению жизнестойкой молоди трепанга необходимо строгое выполнение комплекса противоэпизоотических мероприятий, обеспечивающих надлежащее санитарное состояние и предотвращение массовой гибели взрослых особей (производителей), выращиваемых личинок и молоди.

Методика санитарной обработки систем жизнеобеспечения разработана на основе опыта работ в заводских условиях НППМ «Заповедное».

Для предотвращения развития сапротрофной и патогенной микрофлоры перед началом работ все помещения и оборудование должны быть вымыты и продезинфицированы. Санитарная обработка должна проводиться в мае перед началом основных работ.

Для санитарной обработки рекомендуется использовать раствор хлорамина с активностью хлора 0,8–1,0 %. Подобные растворы широко используются и при санитарной обработке медицинского оборудования, посуды, инвентаря и технологического оборудования на предприятиях пищевой промышленности, рыбообрабатывающих предприятиях и судах (Инструкция по мойке ..., 1985; Инструкция по санитарной обработке ..., 1985).

Хлорамин обладает бактерицидным свойством. Раствор хлорамина при температуре 40–50 °С обладает большой хлорной активностью, при минимальной его потере. При хранении растворов хлорамина в посуде из темного стекла с притертой пробкой их активность сохраняется до 15 сут (СанПиН 2.3.5.021-94; СанПиН 2.3.4.545-96). Обрабатывать раствором хлорамина необходимо только предварительно вымытые моющими составами поверхности, так как остатки органических веществ связывают хлор и снижают его бактерицидное действие.

Применение антисептических препаратов типа «Антибак-500» не обеспечивает гарантированного уничтожения микрофлоры. Действующим антимикробным компонентом препарата «Антибак» является ципрофлоксацин, обладающий широким спектром действия. Вместе с тем антимикробный эффект при его применении проявляется только при условии постоянного поддержания его в воде в течение 5–7 сут.

Схема санитарной обработки систем жизнеобеспечения и помещений включает в себя следующие этапы:

1. Обработка всех помещений (стены, потолки, полы, наружные части трубопроводов) моющими средствами и раствором хлорамина в пресной воде. В условиях повышенной влажности в помещении на стенах, потолках, поверхностях труб, стенках бассейнов возможно развитие грибка. В этом случае необходима обработка помещений сернистым газом (использовать серные дымовые шашки, которые применяются для этой цели в быту).

2. Промывка песчано-гравийного фильтра и его перезагрузка. Фильтр разбирается, все его детали отмываются пресной водой от присутствующих осадков, а затем в течение 1 ч обрабатываются раствором хлорамина. Песчано-гравийная загрузка промывается пресной водой и прокаливается при температуре 200 °С. После промывки и сборки фильтр заполняется пресной водой на 3–4 ч для удаления присутствия следов хлорамина, после чего вода из фильтра сливается.

3. Механическая очистка и промывка накопителей и распределительных баков водоподогрева от осадка. Стенки и дно емкостей очищаются с помощью пластиковых щеток, загрязнения смываются пресной водой. Затем сосуды и соединительные трубы на сутки заполняются раствором хлорамина в пресной воде. Для экономии раствора хлорамина он может быть последовательно использован для промывки нескольких накопительных емкостей. Перекачка раствора из одной емкости в другую осуществляется с помощью погружного насоса. Затем насосами раствор хлорамина перекачивается в напорные баки (емкости водоподогрева). Обработка напорных баков раствором хлорамина проводится в течение суток.

4. Промывка системы трубопроводов. Осуществляется путем заполнения ее на сутки раствором хлорамина. Раствор хлорамина подается самотеком из напорных емкостей. Для полного заполнения системы трубопроводов хлорсодержащим раствором необходимо последовательно пролить все имеющиеся в системе краны. В контуре подачи очищенной воды это желательно делать при включенных насосах циркуляции воды.

5. Обработка сосудов отделений нереста, выращивания личинок и молоди трепанга. Осуществляется путем последовательного заполнения на 2–3 ч каждого сосуда дезинфицирующим раствором, который подается из напорного бака. Затем сосуды на сутки заполняются пресной водой для удаления следов хлорамина.

6. Из трубопроводов раствор хлорамина сливается в емкости для культивирования и используется для их промывки. При необходимости в раствор может быть добавлен хлорамин.

7. После обработки раствором хлорамина для удаления остатков хлора емкости и трубопроводы на сутки заполняются пресной водой. По окончании санитарной обработки те части системы, в использовании которых нет необходимости в настоящий момент, осушаются.

Показателем санитарного состояния системы водоподготовки и водоподачи служит отсутствие роста численности микрофлоры в воде и отсутствие в ней взвеси.

Обработанные и промытые сосуды до проведения работ по культивированию трепанга осушаются и закрываются пыльниками (тканью, полиэтиленовой пленкой и т.д.).

Непосредственно перед началом работ осуществляется промывка всей системы водообеспечения путем ее заполнения морской водой на 2–3 дня. При этом производится отбор проб воды на микробиологический анализ. Определяется численность микроорганизмов в воде в районе водозабора, поступающей из водозабора (напрямую), прошедшей через песчано-гравийный фильтр, а также подаваемой в емкости для культивирования. Показателем качества санитарной обработки является нормализация численности микрофлоры воды в системе жизнеобеспечения на уровне фоновой в море ($3,0 \cdot 10^3$ кл.).

В процессе проведения работ по культивированию необходимо периодически (один раз в 5–7 дней) осуществлять микробиологический контроль. В случае если в подаваемой воде отмечается увеличение численности бактерий или большое количество взвеси, необходимо проверить состояние фильтров, усилить обработку воды озонаторами и УФ-облучателями, а также провести повторную промывку системы трубопроводов дезинфицирующим раствором. На проведение данного мероприятия потребуется не более двух суток.

В системе водоподготовки возможно накопление органики (трофической основы для микрофлоры). Сроки накопления органики в большей степени зависят от концентрации ее в районе водозабора, эффективности очистки поступающей воды фильтрами, мощности проточных УФ-облучателей и озонаторов. Из опыта китайских специалистов известно, что каждые 4–5 лет, при отсутствии генеральной санобработки цехов, происходит загрязнение систем водообеспечения, что вызывает массовую гибель личинок.

Установлено, что при загрязнении систем водообеспечения активно развиваются бактерии рода *Bacillus*, для которых характерна адгезия и образование биопленок и колоний на твердых субстратах (Родионова и др., 2003). Ука-

занный микроорганизм обладает высокой скоростью развития: удвоение численности может происходить за 10 мин. Являясь гетеротрофным организмом, бациллюс может способствовать развитию на органических субстратах гнилостных процессов.

Массовое развитие бациллюса сопровождается образованием на стенках сосудов и труб и поверхности воды сплошной пленки (рис. 19), основу которой составляет масса бактерий и простейших.



Рис. 19. Биопленка на стенках сосудов

Образование биопленки приводит к массовой гибели личинок. Она начинается с момента перехода личинок на экзогенное питание, причем большая часть их погибает в первые дни выращивания. Это связано с тем, что продуктами метаболизма бактерий рода *Bacillus* являются биогенные амины, фенолы, газообразные вещества типа сероводорода, индола и ряд других соединений, обладающих цитотоксическим действием. При массовом развитии микрофлоры в воду выделяется большое количество продуктов метаболизма, что, очевидно, является причиной гибели личинок.

Кроме бактерий рода *Bacillus*, в воде обнаруживаются представители рода стафилококков, которые не являются специфическими обитателями морских вод. Очевидно, эти бактерии, которые распространяются воздушно-

капельным путем, могут заноситься человеком и животными. В благоприятных для них условиях (относительно высокая температура среды) они активно размножаются на органических субстратах. Одним из наиболее опасных стафилококков является патогенный вид *Staphylococcus aureus*, который выделяет во внешнюю среду сильнейший токсин. При выявлении стафилококков необходимо принимать срочные меры борьбы с ним — промывку системы дезинфицирующим хлорсодержащим средством. Применение других средств обработки: марганцовокислого калия, УФ-облучателей — в этом случае малоэффективно.

ГЛАВА 5. МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО КУЛЬТИВИРОВАНИЮ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Микроводоросли, которые используются в качестве корма для личинок трепанга, должны иметь высокую кормовую ценность и отвечать требованиям массовой культуры: обладать способностью к быстрому накоплению численности в культуре; быть устойчивыми к возможным изменениям условий среды. При выращивании личинок в качестве корма могут использоваться только водоросли с размерами клеток 8–20 мкм, клеточные стенки которых достаточно тонкие и могут легко перевариваться личинками; клеточная мембрана либо отсутствует, либо тоже достаточно тонкая. Перечисленным требованием в полной мере отвечают такие виды, как *D. salina* и *Ch. muelleri*. При переходе личинок в стадию поздней аурикулярии и далее в долиолярию в рацион необходимо добавлять такой вид, как *Ph. tricornutum*, клетки которого также лишены плотной оболочки, хорошо перевариваются и усваиваются выращиваемыми личинками и при этом характеризуются высокими скоростями роста и быстро наращивают свою численность. Описание видов микроводорослей представлено в прил. 1.

Микроводоросли культивируются в несколько этапов.

Первый этап включает в себя содержание коллекционных (музейных) культур водорослей методом их последовательного пересева. На этом этапе при проведении работ необходимо неукоснительно поддерживать режим стерильности. Все манипуляции с водорослями проводятся в специальном боксе, где поддерживаются стабильные условия — уровень освещенности и

температура воздуха. Для поддержания режима стерильности необходимо до и после каждой манипуляции с водорослями мыть руки, протирать рабочие поверхности дезинфицирующими растворами и на 15 мин включать УФ-облучатель.

На втором этапе культивирования осуществляется наращивание (или разгонка коллекционных культур) культур микроводорослей в объемах, достаточных для использования в качестве посевных (маточных) культур на третьем этапе. Эта «промежуточная» культура далее используется в качестве посевной (инокулята) для массового культивирования водорослей, так называемой «кормовой культуры». На втором этапе необходимо поддерживать тот же режим стерильности, что и на первом этапе.

На третьем этапе культивирования водоросли выращиваются в специальных емкостях (фотореакторах) в объемах, необходимых для обеспечения кормом личинок трепанга. Для ежедневного получения суспензии микроводорослей необходимого количества и качества массовое выращивание микроводорослей проводят в несколько циклов, которые последовательно сменяют друг друга. В каждом цикле выращивания используется необходимое количество фотореакторов. Для примера, используем 8 фотореакторов. Каждый очередной цикл выращивания запускается через 2 сут от начала предыдущего (см. линейный график массового культивирования микроводорослей в прил. 2). Один цикл выращивания составляет 6 сут. К этому времени культуры микроводорослей переходят в фазу замедления роста. Далее выращивать водоросли не рекомендуется, так как это может привести к массовому развитию бактерий и простейших, что губительно сказывается как на самой культуре водорослей, так и на развитии личинок трепанга, которых кормят этими водорослями.

Питательные среды для культивирования микроводорослей

Культивирование микроводорослей осуществляется на жидких питательных средах, основу которых составляет пастеризованная морская вода.

Для упрощения приготовления питательных сред готовят концентрированные растворы реактивов — компонентов питательных сред на основе дистиллированной воды — и далее в подготовленную морскую воду добавляют необходимый объем этих растворов.

**Концентрированные растворы для приготовления
питательных сред (табл. 8, 9)**

Таблица 8

Пропись для приготовления концентрированных растворов реактивов —
компонентов питательной среды Гольдберга

№ раствора	Наименование реактива	г/100 мл дистиллированной воды
I	KNO ₃	10,1
II	Na ₂ HPO ₄	1,421
III	FeCl ₃ 6H ₂ O	0,0270
	MnCl ₂ 4H ₂ O	0,0198
	CoCl ₂ 6H ₂ O	0,0238

Таблица 9

Пропись для приготовления концентрированных растворов реактивов —
компонентов питательной среды «F/2»

№ раствора	Наименование реактива	г/100 мл дистиллированной воды
I	Натрий азотнокислый NaNO ₃	7,5
	Натрий фосфорнокислый 1-замещенный NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0,5
II	Натрий кремневокислый Na ₂ SiO ₃ 9H ₂ O	3,0
III	Медь сернокислая пятиводная CuSO ₄ 5H ₂ O	0,001
	Цинк сернокислый семиводный ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,0022
	Кобальт хлористый шестиводный CoCl ₂ 6H ₂ O	0,001
	Марганец хлористый четырехводный MnCl ₂ 4H ₂ O	0,018
	Натрий молибденовокислый двухводный Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,00063
IV	Трилон Б EDTA-Na ₂	0,436
V	Железо хлорное шестиводное FeCl ₃ 6H ₂ O	0,315

Хранение концентрированных растворов осуществляется в бытовом холодильнике при температуре не выше 5 °С в течение 2 нед.

При приготовлении концентрированных растворов необходимо контролировать срок годности используемых солей, их уровень чистоты (химически чистый — «ХЧ» или чистый для анализа — «ЧДА») и водность (количество молекул воды в формуле реактива).

Срок годности реактивов и их уровень чистоты указан на этикетке. Взвешивание реактивов осуществляют на весах, обеспечивающих точность взвешивания до 0,0001 г.

В случае если в используемом реактиве водность отличается от указанной в прописи, необходимо провести перерасчет массы навески реактива. Для этого

сначала необходимо найти истинную концентрацию элемента в питательной среде по формуле:

$$X = M_{\text{соли}} \cdot (MM_{\text{элемента}} \cdot 100 / MM_{\text{соли}}) / 100,$$

где X — концентрация элемента, мг/л; $M_{\text{соли}}$ — навеска соли, мг/л; $MM_{\text{элемента}}$ — молекулярная масса элемента; $MM_{\text{соли}}$ — молекулярная масса соли.

Далее необходимо найти содержание элемента в процентах в имеющейся в наличии подобной соли, но с другой водностью по формуле:

$$Y = MM_{\text{элемента}} \cdot 100 / MM_{\text{соли}},$$

где Y — содержание элемента, %; $MM_{\text{элемента}}$ — молекулярная масса элемента; $MM_{\text{соли}}$ — молекулярная масса соли.

Далее по формуле необходимо пересчитать, сколько надо взять имеющейся в наличии соли с известным процентным содержанием элемента, чтобы получить нужную концентрацию элемента в среде:

$$M_{\text{соли}} = X \cdot 100 / Y,$$

где $M_{\text{соли}}$ — необходимая навеска соли, мг/л; X — концентрация элемента, мг/л; Y — содержание элемента, %.

Приготовление питательной среды

Для приготовления 1 л питательной среды «F/2» добавляют по 1 мл каждого раствора в 0,75 л пастеризованной морской воды и доводят объем (добавлением пастеризованной морской воды) до 1,0 л и перемешивают. Для приготовления 1 л среды Гольдберга добавляют 2 мл раствора № 1 и по 1 мл растворов № 2 и № 3 в 0,75 л пастеризованной морской воды, доводят объем (добавлением пастеризованной морской воды) до 1,0 л и перемешивают. Питательную среду используют сразу после приготовления.

Содержание коллекционных культур микроводорослей

Подготовка посуды

Перед использованием посуда для хранения микроводорослей кипятится с добавлением пищевой соды или в 10 %-ном растворе соляной кислоты (стиральный порошок лучше не использовать, так как от него на колбах остается

пленка, от которой очень трудно избавиться) 10–15 мин. Затем тщательно моется под проточной водой, ополаскивается дистиллированной водой и сушится на воздухе. Сухая посуда обрачивается пергаментной бумагой или калькой и стерилизуется в сухожаровом шкафу при температуре 200 °С в течение 2 ч. После того как колбы остыли (лучше прямо в шкафу), их используют для пересева либо хранят в специальном шкафу для стерильной посуды.

Подготовка морской воды

Морскую воду фильтруют через бумажный фильтр 0,2 мкм. Затем трижды, через каждые сутки, нагревают до 80 °С и выдерживают при этой температуре не менее 20 мин. Хранить готовую пастеризованную морскую воду можно не более 1 нед. При необходимости приготовления больших объемов морской воды применяется методика, описанная в разделе «Приготовление пастеризованной морской воды» настоящей инструкции.

Методы учета численности клеток микроводорослей

1. Метод прямого подсчета

Продуктивность водорослей контролируется путем учета динамики численности клеток или биомассы водорослей в расчете на сухую массу в единице объема суспензии. Подсчет клеток осуществляется в камере Горяева, хотя можно также считать в любой камере, предназначенной для подсчета форменных элементов крови (Тома, Фукса-Розенталя). Объем камеры составляет 0,0001 мл. На рабочую поверхность камеры нанесена масштабная сетка из 25 небольших квадратов.

Перед взятием пробы для подсчета суспензию микроводорослей необходимо осторожно перемешать.

Пробы водорослей перед подсчетом фиксируются раствором Люголя (1 капля на 2–3 мл пробы).

Суспензию водорослей помещают в камеру под покровное стекло и просчитывают их количество во всех квадратах; полученную сумму умножают на 10^4 и получают число клеток в 1 мл суспензии.

При подсчете клеток в камере Горяева необходимо соблюдать следующие правила:

- ✓ плотно притереть покровное стекло к поверхности камеры;
- ✓ отобранную в пипетку пробу осторожно нанести на рабочую поверхность камеры под стекло, пока клетки не успели осесть в нижней части пипетки;

- ✓ не допускать высыхания капли под стеклом;
- ✓ просчитывать 2–3 пробы, брать среднее значение;
- ✓ при повторном подсчете клеток их суспензию в камеру наносить не из одной и той же пробы, а при вторичном отборе пробы суспензии в пипетку.

2. Метод учета с использованием КФК описан в прил. 3.

Пересев и хранение коллекционных культур микроводорослей

На этом этапе при проведении работ необходимо неукоснительно поддерживать режим стерильности. Все манипуляции с водорослями проводятся в специальном боксе, где поддерживаются стабильные условия — уровень освещенности и температура воздуха.

Сохранение маточной культуры осуществляется методом их периодического пересевивания. Посев культуры следует проводить для *D. salina* раз в 10–14 дней, для *Ch. muelleri* и *P. tricornutum* — раз в 7–10 дней.

Необходимо соблюдать и поддерживать следующие режимы хранения культур:

1. Температура 15–20 °С.
2. Уровень освещенности не менее 10–12 кЛк с длиной светового дня 12–24 ч; для этого используют искусственные источники света, такие как люминесцентные лампы (ЛБ-40, ЛБ-80).
3. Перемешивание культур (взбалтыванием) надо осуществлять 1–3 раза в сутки для улучшения газообмена (O_2 и CO_2) и предотвращения оседания клеток водорослей.

Перед пересевом необходимо определить количество водорослей в исходной культуре (методы подсчета приведены в разделе «Методы учета численности клеток микроводорослей»). Далее проводится посев. В стерилизованную посуду со стерильной морской водой помещают растворы компонентов питательной среды, содержимое тщательно перемешивается, затем вносится маточная культура микроводорослей. Для этого стерильной пипеткой отбираются более жизнестойкие водоросли из поверхностного слоя исходной культуры и переносятся в колбу. Обязательно перед внесением культуры водорослей горлышко колбы обжигают над спиртовкой. После этого горловина колбы закрывается фильтровальной бумагой. Бумагу необходимо предварительно подержать над спиртовкой несколько секунд для стерилизации. Полученная начальная концентрация клеток водорослей в культуре должна быть не менее 40 тыс. кл./мл. Для получения заданной концентрации клеток в миллилитре среды

необходимо в определенный объем питательной среды добавить определенный объем вносимой исходной культуры клеток. Для определения объема культуры клеток, который надо внести, используют следующую формулу расчета:

$$V = V_{\text{треб}} : (X_{\text{исх}} : X_{\text{треб}}),$$

где V — объем культуры, который необходимо влить, мл; $V_{\text{треб}}$ — нужный объем культуры, мл; $X_{\text{исх}}$ — концентрация клеток в исходной вносимой культуре, кл./мл; $X_{\text{треб}}$ — требуемая концентрация клеток микроводоросли в объеме $V_{\text{треб}}$, (кл./мл).

Для примера, если нам надо получить 100 мл раствора с концентрацией водоросли 40 тыс. кл./мл и имеется водоросль с концентрацией 2 млн кл./мл, то, используя данную формулу, получим:

$$V = 100 : (2000000 : 40000) = 2 \text{ мл.}$$

Таким образом, для получения в 100 мл концентрации 40 тыс. кл./мл необходимо внести 2 мл культуры с концентрацией 2 млн кл./мл.

После пересева колбы с культурами переносят в бокс (рис. 20).



Рис. 20. Коллекция микроводорослей в боксе

Массовое культивирование микроводорослей

Выращивание промежуточной культуры микроводорослей

На этом этапе при проведении работ необходимо неукоснительно поддерживать режим стерильности. Все манипуляции с водорослями проводятся в специальном помещении, где поддерживаются стабильные условия: уровень освещенности и температура воздуха (рис. 21).



Рис. 21. Стеллаж для выращивания промежуточной культуры микроводорослей

Подготовка посуды, стерилизация морской воды и приготовление питательных растворов осуществляется как и в первом этапе. Для увеличения скорости роста микроводорослей допустимо добавлять витамины В₁ (2 мл/100 л), В₁₂ (1 мл/100 л).

Технология посева микроводорослей такая же, как и в первом этапе, но начальная концентрация клеток водорослей в культуре должна быть выше (250 тыс. кл./мл). Это необходимо для уменьшения времени адаптации культуры и более быстрого размножения клеток водорослей.

Культура водорослей содержится при постоянном освещении (10–12 кЛк), перемешивание (взбалтыванием) осуществляется 3–4 раза в день, лучше организовать барботаж воздухом. Для этого используют аквариумный компрессор. К компрессору подсоединяют силиконовый шланг, который входит в плотно

закрытую колбу с ватным фильтром. Далее к выходному отверстию этой колбы прикрепляют силиконовый шланг со стеклянным барбатором на конце. Температура культивирования — 20–21 °С.

Все манипуляции с культурой должны выполняться с обязательным соблюдением стерильности, так как от качества промежуточной культуры зависит результативность всей дальнейшей работы с кормовой культурой.

Приготовление пастеризованной морской воды

Для приготовления пастеризованной морской воды в цехе НПЦМ «Заповедное» воду предварительно фильтруют пропуская через батарею из трех картриджей, с диаметрами отверстий мембран 1,0; 0,5 и 0,2 мкм (рис. 22).

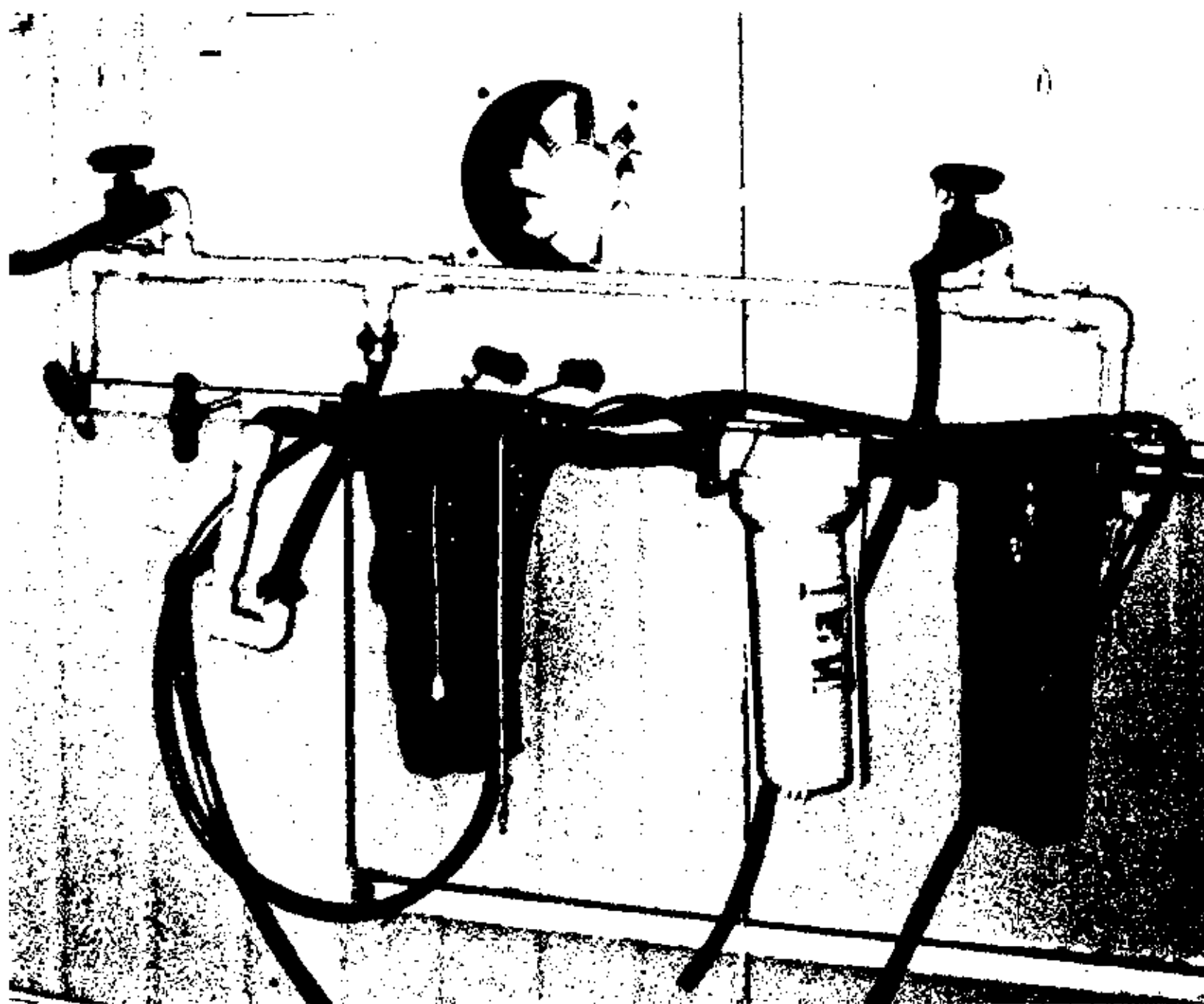


Рис. 22. Батарея картриджей для фильтрования морской воды

Скорость фильтрации воды не должна превышать 2 л/мин. Перед началом фильтрации необходимо промыть фильтр 20 л морской воды.

После окончания каждой фильтрации фильтр необходимо отсоединить от морского водопровода, присоединить к пресному водопроводу и промыть его

20 л пресной воды, чтобы предупредить развитие в нем морской микрофлоры. Лучше промывать картриджи пресной водой в режиме противотока.

Фильтрованная вода скапливается в емкости для пастеризации морской воды объемом 100 и 150 л (рис. 23).



Рис. 23. Емкости для пастеризации морской воды

Далее фильтрованную морскую воду трижды, через каждые сутки, нагревают до 80 °С. Время нагрева составляет около 8 ч для 150-литровой емкости и 6 ч для 100-литровой. До комнатной температуры вода в сосудах охлаждается примерно за 20–24 ч.

После 3-го нагрева горячую воду разливают самотеком через силиконовый шланг по фотореакторам. Время остывания воды в фотореакторе до рабочей температуры около 6 ч.

Подготовка фотореакторов

В качестве сосудов для выращивания микроводорослей — фотореакторов — используются пластиковые 30-литровые емкости, оснащенные штуцерами для

подачи воздуха и питательной среды. Фотореакторы герметично закрываются полиэтиленовой пленкой, закрепленной резиновым жгутом (рис. 24).



Рис. 24. Фотореакторы с суспензией микроводорослей

Подготовка фотореактора включает в себя его стерилизацию хлорамин-ом (0,5 % в течение 4–6 ч, обязательно на свету), можно перекисью водорода в течение 3–5 ч или разведенной 1 : 1 соляной кислотой. После обработки и 8–10-кратной промывки пресной водой фотореакторы ополаскивают дистиллированной водой и протирают ватным тампоном, смоченным этиловым спиртом. Таким же способом обрабатывают шланги для подачи воздуха.

Также промывают и стерилизуют этиловым спиртом полиэтиленовые пленки, закрывающие фотореакторы. Перед запуском необходимо проверить воздушный фильтр, продуть его, протереть. Продуть распределительный воздушный коллектор, подсоединить шланги для подачи воздуха. После заполнения фотореакторов водой необходимо отрегулировать подачу воздуха в каждом фотореакторе. Установить средний уровень барботажа.

Пример расчета необходимого количества фотореакторов приведен в прил. 4.

В качестве сосудов для выращивания микроводорослей — фотореакторов — можно использовать полиэтиленовые рукава диаметром 0,3 м и высотой до 1,0 м (рис. 25).



Рис. 25. Выращивание микроводорослей в полиэтиленовых рукавах

Приготовление питательной среды в фотореакторе

Чтобы избежать переполнения фотореактора необходимо изначально заполнять его на $2/3$ пастеризованной морской водой, а затем довести до необходимого объема после добавления питательных растворов и засевной культуры водорослей.

В связи с тем что при культивировании микроводорослей возможно образование пены на поверхности жидкой фазы, фотореактор заполняется не до полного объема. Так, после всех добавок 30-литровый фотореактор должен быть заполнен только на 25 л.

Добавление концентрированных растворов питательных веществ в фотореакторы осуществляют при помощи стеклянной воронки с силиконовым шлангом, для каждого вида водорослей — индивидуальной. Перед присоединением воронки к рабочему штуцеру надо протереть стеклянную трубку штуцера ватным тампоном с этиловым спиртом и слить около 20 мл воды из фотореактора. Используя воронку, через рабочий штуцер в фотореактор заливают компоненты концентрированной питательной среды в нужных пропорциях.

Обязательно перед тем, как поместить в фотореактор засевную культуру микроводорослей, необходимо через воронку залить туда около 50 мл пастеризованной морской воды, чтобы избежать контакта культуры водорослей с концентрированным раствором.

Посев водорослей

После перемешивания питательной среды воздухом в течение 1–3 мин в фотореактор через ту же воронку вносят водорослевую культуру нужной концентрации.

Посев водорослей в каждый фотореактор осуществляется однократно из колбы с «промежуточной» культурой. После засева начальная концентрация водорослей в фотореакторах должна быть выше, чем начальная концентрация в колбах с промежуточной культурой (более 250–300 тыс. кл./мл) для уменьшения времени адаптации культуры.

Для определения объема культуры клеток, который надо внести в фотореактор, используют формулу расчета (см. раздел «Пересев и хранение коллекционных культур микроводорослей»).

После окончания всех операций необходимо промыть промывалкой с дистиллированной водой рабочий шпатель фотореактора.

Далее происходит процесс выращивания при поддержании постоянных условий среды: температура 21–23 °С, непрерывное и достаточное освещение (не менее 10 клк), перемешивание (барботаж воздухом).

После того как культура водорослей набрала необходимую концентрацию клеток, а это происходит на 6-й день выращивания (для *D. salina* более 1 млн кл./мл, *Ph. tricornutum* более 6 млн кл./мл, *Ch. muelleri* более 3 млн кл./мл), ее можно использовать для кормления личинок трепанга. В этой фазе роста микроводоросли наиболее богаты питательными веществами и, уже находясь в бассейне с личинками, еще способны размножаться.

Превышать длительность выращивания водорослей нельзя, так как это может привести к массовому развитию бактерий и простейших в культуре, что губительно сказывается как на самой культуре водорослей, так и на развитии личинок трепанга, которых кормят суспензией этих водорослей.

Для того чтобы избежать заражения культуры другими, одновременно культивируемыми видами водорослей или простейшими, необходимо:

- строго соблюдать стерильность на всех этапах культивирования;
- производить посадку только в последовательности: маточная культура → промежуточная культура → кормовая культура;
- за каждым видом водорослей должны быть закреплены свои емкости (фотореакторы); ни в коем случае их не менять даже после обработки;
- ежедневно заносить всю информацию в специальный журнал.

Оценка объемов сосудов, расхода морской воды и количества кормов, необходимых для выращивания 1 млн экз. жизнестойкой молоди трепанга, приведена в прил. 5.

Перечень материалов и оборудования для культивирования микроводорослей указан в прил. 6.

ГЛАВА 6. ТЕХНИЧЕСКОЕ ОСНАЩЕНИЕ ЗАВОДА ПО ПОЛУЧЕНИЮ МОЛОДИ ТРЕПАНГА

Общие требования. Оснащение предприятия должно обеспечивать все этапы биотехнологии получения жизнестойкой молоди трепанга. Исходными параметрами являются потребности трепанга к качеству водной среды и бионормативы его выращивания на всех стадиях развития, изложенные в настоящей инструкции, а также в более ранних материалах (Временная инструкция ..., 1988, 2003; Суй Силинь, 1990).

Предприятие должно иметь отделение нереста, отделение личинок, отделение молоди, отделение микроводорослей, морской водозабор с насосной станцией и отделение водоподготовки, обеспечивающее требуемые параметры водной среды. Кроме того, необходима лаборатория для проведения гидрохимических, ихтиологических и экологических исследований и обеспечения контроля над технологическим процессом, специальное помещение для хранения маточных культур микроводорослей и прочие помещения для хранения химреактивов, инвентаря и бытовых нужд.

Все используемые сосуды, трубопроводы и прочее оборудование, контактирующее с морской водой, в которой осуществляется выращивание трепанга, должно быть изготовлено из нейтральных материалов. Не допускается содержание в них меди, свинца, кадмия, мышьяка.

При планировке помещений предприятия должна учитываться технологическая последовательность выполнения этапов процесса выращивания молоди трепанга. Расположение отделений должно обеспечивать наиболее короткие пути перемещения выращиваемого трепанга, кормов и т.д. Большое значение имеет удобство работы обслуживающего персонала.

Одна из наиболее важных составляющих завода — снабжение его морской водой в нужном количестве и требуемого качества.

Морской водозабор. Забор морской воды должен производиться на участке моря с чистой водой, которой не требуется специальная очистка. Требования к качеству воды достаточно высоки. Поэтому точка забора воды должна располагаться в бухте не подверженной сильным штормовым воздействиям с перемеще-

нием грунтов, не имеющей мощного речного стока, вызывающего даже периодическое распреснение или вынос загрязнения. Вместе с тем бухта должна быть глубоководной — в месте забора воды не менее 10 м. Грунты в месте забора воды должны быть песчаные или песчано-галечные.

На стадии проектирования необходимо оценить микробиологическую характеристику воды и грунтов в точке предполагаемого водозабора с целью выбора оптимального места для данной акватории. Не следует размещать водозабор в местах стока рек и различных техногенных выбросов: ливневая канализация, стоки промышленных производств и т.д.

Конструкция оголовка может быть различной. Единственным условием является рыбозащитное ограждение, регламентированное Водным Кодексом РФ и другими нормативными актами. Рыбозащитное сооружение должно предотвращать попадание рыбы в водовод. Поэтому оголовки изготавливаются в виде сетки, диаметр отверстий в которой превышает в несколько раз диаметр трубопровода, чтобы не создавался эффект всасывания воды в окрестностях оголовка. Оголовки устанавливаются вертикально на высоте около 2 м над дном (для предотвращения попадания донных отложений в водовод). Принципиально оголовки могут помещаться ниже уровня дна. Тогда слой грунта над оголовком будет являться своеобразным первичным фильтром (этот слой должен иметь строго определенные фракции и последовательность их укладки). К недостаткам таких оголовков следует отнести сложности в эксплуатации, связанные с периодической заменой фильтрующего слоя.

Проектирование водозаборного сооружения целесообразно поручать специализированной организации, гарантирующей долговечность данного сооружения и экологическую безопасность.

Забираемая из моря вода должна подаваться в приемный бак или отстойник. Естественно, отстойник располагается выше уровня моря и для подъема воды необходима насосная станция. При выборе насосов следует учитывать:

- высоту всасывания насоса (определяет возможное место установки насоса по отношению к уровню воды в море с учетом прилива-отлива) $H_{вс}$ (рис. 26);
- высоту нагнетания насоса (определяет допустимый уровень подъема воды от насосной станции до верхней точки трубопровода в приемном баке) H_n (рис. 26);
- объемную характеристику насоса «напор—подача» (определяет, какое количество воды может перекачиваться при заданном напоре) $Q-H$ (рис. 27);
- параметры трубопроводов на всасывании и нагнетании (фактически создаваемое гидравлическое сопротивление потоку воды составными элементами трубопроводов от водозаборного устройства до насоса и от насоса до слива) dH (рис. 27).

Рис. 26. Схема расположения элементов водозабора

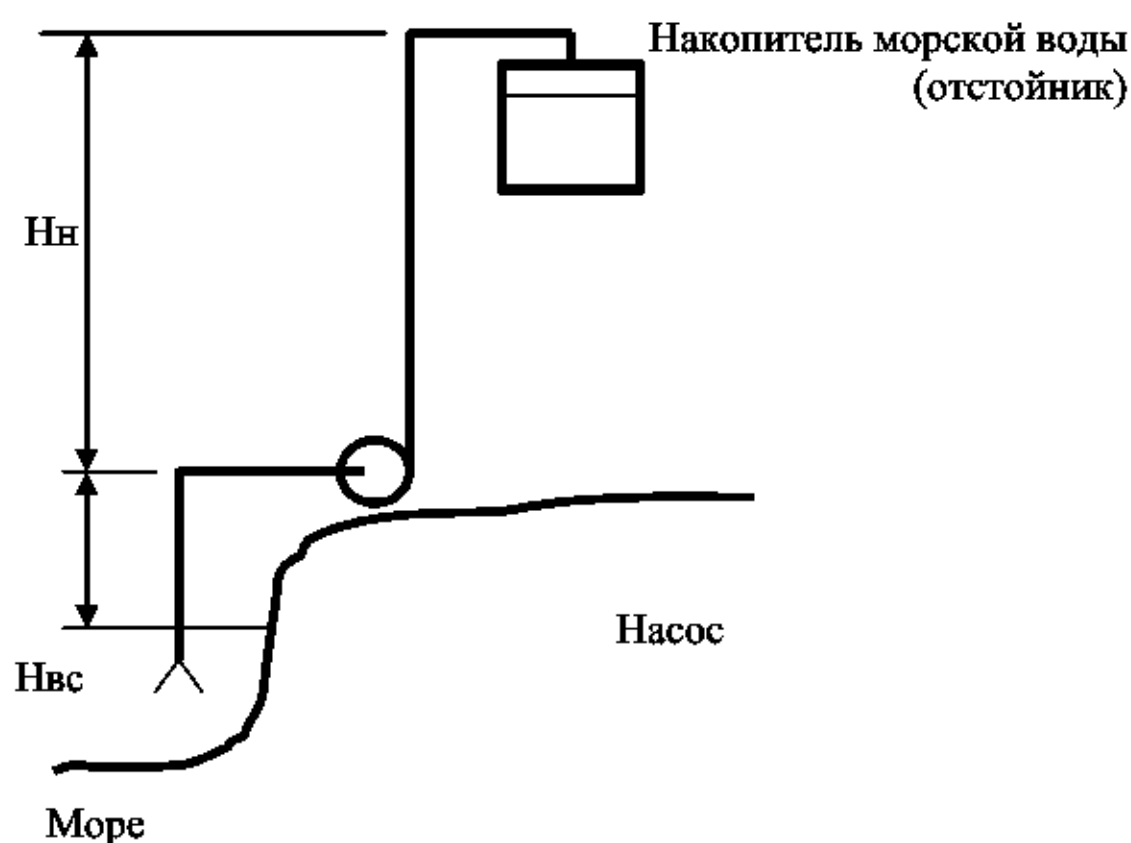
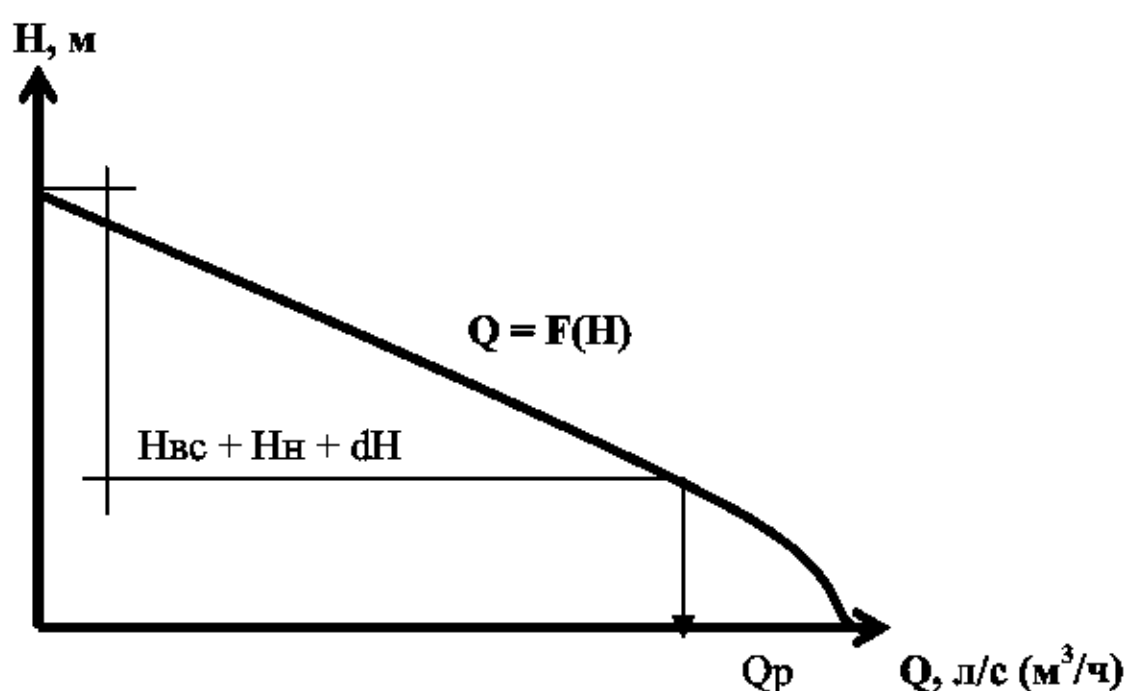


Рис. 27. Расчет фактического расхода воды



Гидравлическое сопротивление создает потерю напора как на всасывании, так и на нагнетании, что необходимо учесть при расчете насоса.

Гидравлический расчет выполняется по традиционным методикам исходя из выбранного оборудования (СНиП 2.04.02-84; Курганов, Федоров, 1986).

В настоящее время в водозаборах широко используются центробежные насосы с рабочими элементами для агрессивных жидкостей. Рабочее колесо вращается в капсуле из высокопрочного нетоксичного материала на керамическом стержне. Связь с электродвигателем осуществляется посредством магнитной муфты, обеспечивающей плавность запуска. При этом морская вода не соприкасается с сальниками подшипников. Выпускаются насосы в Японии, Германии, США, Китае и других странах.

В традиционной практике вода забирается насосами и подается в емкость, где отстаивается не менее 2 сут. При этом отстойник должен быть поделен на секции для периодической чистки и удаления скапливающегося загрязнения. Чистка секций должна осуществляться не реже 1 раза в неделю.

Более прогрессивным является подача в отстойник-накопитель воды, прошедшей первичную очистку. Первичная очистка воды необходима для удаления взвесей, органических частиц и различных пелагических растений, попавших в водозабор. Для первичной очистки могут использоваться стандартно выпускаемые напорные песчано-гравийные фильтры (ПГФ). Качество первичной очистки зависит от диаметра гранул загрузки ПГФ. Известно, что размер частиц, проходящих через такой фильтр, будет не более 15 % от диаметра гранул загрузки. Загрузка фильтра, как правило, состоит из 2–3 фракций, разделенных по высоте. Поскольку в ПГФ обычно верхний слой состоит из песка со средним диаметром в 1 мм, то очистка будет до 150 мкм (рис. 28).

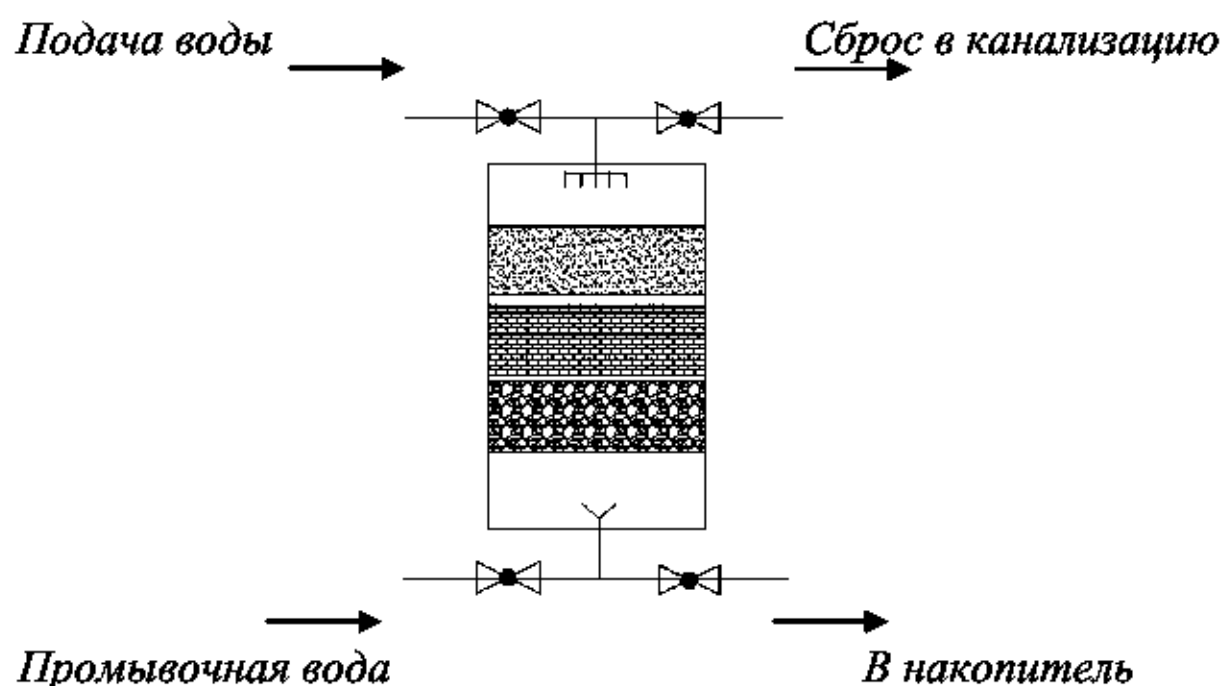


Рис. 28. Схема первичной фильтрации воды

Промывка ПГФ осуществляется по установленному регламенту обратным током воды. Частота промывок зависит от параметров фильтра и объема прокачиваемой воды. Рекомендуется промывка 1–2 раза в неделю (зависит от мутности воды и наличия в ней взвесей).



В дополнении к ПГФ можно включать в схему самопромывные механические фильтры, обеспечивающие очистку до 50 мкм и даже до 20 мкм, например, типа «Ураган» (рис. 29).

В дополнении к ПГФ можно включать в схему самопромывные механические фильтры, обеспечивающие очистку до 50 мкм и даже до 20 мкм, например, типа «Ураган» (рис. 29).

Рис. 29. Самопромывные фильтры типа «Ураган»

Отстаивание воды применяется для дальнейшей ее очистки. Кроме того, отстойник обеспечивает запас воды на определенное время (обычно продолжительность отстаивания около 24 ч).

Если не будет предварительной фильтрации, то возникнет необходимость чистки отстойника через каждые 2–4 дня от содержащейся в воде взвеси, поскольку в противном случае в отстойнике начнут образовываться токсичные вещества, ухудшающие качество воды.

Отделение водоподготовки. Задачи данного отделения заключаются в подготовке воды требуемого качества для различных стадий выращивания трепанга. В технологическом процессе трепанг может быть на стадии производителей, личинок и молоди. Требования к качеству воды на разных стадиях различные.

Для морской воды, подаваемой к производителям, достаточно первичной очистки или отстаивания.

Для молоди (ее размер от 700 мкм до нескольких сантиметров) необходима очистка до уровня 50–150 мкм. Такая очистка обеспечивается песчано-гравийными фильтрами в комбинации с самопромывными механическими фильтрами.

Для личинок, размер которых от 150 мкм, необходима более тщательная очистка воды. Следовательно, необходима дополнительная фильтрация воды до уровня 10–20 мкм, а также ее обеззараживание, например, с помощью УФ-облучателя (рис. 30).

Рис. 30. УФ-облучатель НПО «ЛИТ»



Для фильтрации воды, подаваемой в отделение личинок, могут применяться картриджные фильтры типа SL-10, 20 и BV-10, 20, выпускаемые серийно и обеспечивающие очистку до 5–20 мкм. Картриджи типа SL имеют ресурс от 30 до 50 тыс. л и выбираются по допустимой нагрузке 25–50 л/мин на картридж. Картриджи типа BV имеют в 3–4 раза больший ресурс и допустимую

нагрузку в 75–150 л/мин на картридж. При больших расходах воды требуется достаточно частая замена картриджей. Поэтому целесообразно также установка самопромывных фильтров, обеспечивающих очистку до 10–20 мкм.

Параметры фильтров и их количество определяются по требуемым расходам воды на личиночное отделение. В процессе выращивания личинок смена воды в бассейнах осуществляется 1 раз в сутки. После личинок в этих же бассейнах можно выращивать молодь, которой требуется водообмен до 3–5 раз в сутки. Поэтому система водоподачи должна быть рассчитана на расход от 0,05 до 0,20 суммарного объема личиночных бассейнов в час.

Стерилизация воды может решаться различными способами. Наиболее простым является включение в систему подачи воды УФ-облучателей. Ультрафиолетовое излучение с длиной волны 220–280 нм является губительным для бактерий. Максимум бактерицидного действия достигается при длине волны 264 нм, что используется в современных УФ-облучателях. В соответствии с действующими нормативными документами для очистки питьевой воды используются дозы УФ-излучения от 16 до 40 мДж/см².

Различные виды микроорганизмов при одинаковых условиях и в одной и той же среде имеют различную степень сопротивляемости к УФ-излучению. Это различие обусловлено строением микроорганизмов и называется УФ-чувствительностью. Наиболее чувствительны к воздействию ультрафиолетового излучения бактерии в вегетативной форме (палочки, кокки), паразитарные простейшие (цисты лямблий, ооцисты криптоспоридий), более устойчивы вирусы. Специальных исследований по степени воздействия УФ-облучения на микроорганизмы в марикультуре не проводилось. Поэтому можно рекомендовать применение типовых устройств, обеспечивающих дозу УФ-излучения от 25 до 40 мДж/см². Достаточно хорошо зарекомендовали УФ-облучатели НПО «ЛИТ» (Россия). Могут применяться УФ-облучатели с озонированием, выпускаемые японской фирмой «Earth Corporation» (Aquaculture ..., 2003).

Кроме трепанга, в технологической схеме производится выращивание микроводорослей для кормления личинок. Здесь необходима еще более глубокая очистка воды (до 0,01 мкм), которая обеспечивает удаление спор всех микроводорослей и очистку от патогенной микрофлоры. Для очистки осуществляют специальную фильтрацию (исключая обратный осмос, в результате которого происходит изменение солевого и ионного состава воды), трехкратное нагревание воды до 80 °С или химическую стерилизацию, как это делают в Китае. Наиболее традиционным считается 3-кратный нагрев воды до 80 °С. Проблемой здесь является агрессивность морской воды, особенно проявляющаяся при нагреве.

Во-первых, емкость, в которой нагревается морская вода, должна быть термически стойкой. Во-вторых, при использовании электрических водонагревателей они должны иметь корпус из титана или другого стойкого к воздействию морской воды и не токсичного материала. Возможно применение двухконтурной схемы нагрева воды, но для этого необходимы пластинчатые теплообменники из титана и титановые насосы в первом контуре. Тогда второй контур может быть выполнен из обычных материалов. Недостатком двухконтурной схемы является ее сложность, достоинством — возможность более быстрого охлаждения после нагрева за счет циркуляции дополнительного теплоносителя во втором контуре.

Различие в степени очистки воды, подаваемой в разные отделения (на разных стадиях технологического процесса), требует создания отдельных контуров или систем подготовки воды, подаваемой в отделения. Как минимум, должно быть три разных степени очистки воды.

Поскольку температура воды в море меняется в течение времени, а выращивание трепанга должно проходить при постоянных во времени температурах, то возникает необходимость нагрева морской воды. Нагрев воды необходим при получении личинок, выращивании молоди, выращивании микроводорослей и стимуляции нереста производителей.

Наиболее важным моментом здесь является принципиальный подход к системе нагрева воды. Нагрев воды в малых объемах на 1–5 °С целесообразно решать методом прямого нагрева с помощью электрических нагревателей, естественно в титановом корпусе. Для нагрева 1 л воды на 1 °С требуется примерно 1 ккал тепла. Соответственно для нагрева 1 т воды на 1 °С потребуется 1 тыс. ккал, или 1,16 кВт/ч (1 Вт = 0,86 ккал/ч) электрической энергии (Справочная книжка ..., 1972). Морская вода нагревается, проходит через бассейны и сбрасывается в природу. В принципе, это не рационально, поскольку затрачивается тепло и далее бесполезно сбрасывается. Прогрессивным является вторичное использование тепла или его рекуперация. При этом тепло отнимается у сбрасываемой воды и за счет него нагревается подаваемая на завод вода. Методов рекуперации несколько: прямая рекуперация, рекуперация с использованием тепловых насосов и т.д. Однако во всех случаях для рекуперации требуется комплекс дорогостоящего оборудования: теплообменники (обязательно титановые в первом контуре), насосы, потребляющие дополнительную энергию (установка насосов необходима как в первом контуре, так и во втором), дополнительное оборудование (тепловые насосы и т.д.). Поскольку дополнительные затраты при рекуперации тепла велики, необходимо просчитывать получаемый эффект в каждом конкретном случае.

Для небольших цехов, где расход воды не превышает 50–100 м³/сут, целесообразно применять устройства прямого нагрева воды. Мощности электронагревателей в 20–30 кВт достаточно для повышения температуры воды на 4–5 °С.

Важным моментом является потребность в аэрации воды. Воздуходувки, применяемые в аквакультуре, обычно отличаются по конструкции от типовых устройств снабжения воздухом промышленных предприятий. Это обычно мембранные компрессоры или ротационные воздуходувки с избыточным давлением порядка 200–300 мбар. Рабочие части воздуходувок выполнены таким образом, что в вырабатываемый воздух не попадают пары смазочных веществ, как это происходит в поршневых компрессорах. Вода аэрируется на глубину 1–2 м. Поэтому создавать большое давление нет необходимости. В практике аквакультуры на 1 м³ воды подается 2–3 м³ воздуха. Отделение водоподготовки обычно оснащается двумя-тремя воздуходувками, обеспечивающими подачу сжатого воздуха для аэрации воды (рис. 31). Этим обеспечивается резерв по мощности и периодичность работы механизмов.

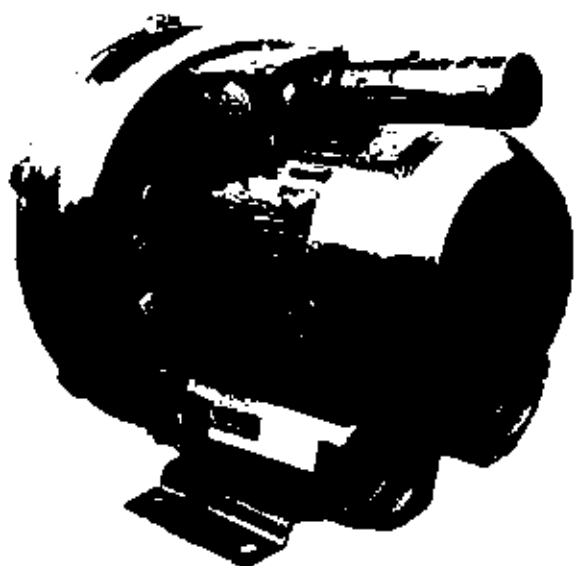


Рис. 31. Воздуходувка для предприятий аквакультуры

Отделение нереста. Отделение нереста предназначено для содержания производителей трепанга и стимуляции их нереста. Поскольку производители могут завозиться в цех при разных исходных температурах воды и отдельными партиями, то необходимо иметь несколько независимых бассейнов (возможно установок) с автономным регулированием температурного режима. Это необходимо как для адаптации производителей в начальный период, так и для температурной стимуляции нереста. Следовательно, должны быть устройства как для охлаждения воды (примерно до 5 °С), так и для нагрева до 25 °С. Точность регулирования температуры желательно иметь на уровне $\pm 0,5$ °С. Скорость повышения или понижения температуры должна обеспечивать 2 °С в сутки. Естественно устройства нагрева и охлаждения должны иметь соприкасающиеся с морской водой части из титана, например, как у агрегатов типа WTCA (Япония) (рис. 32).

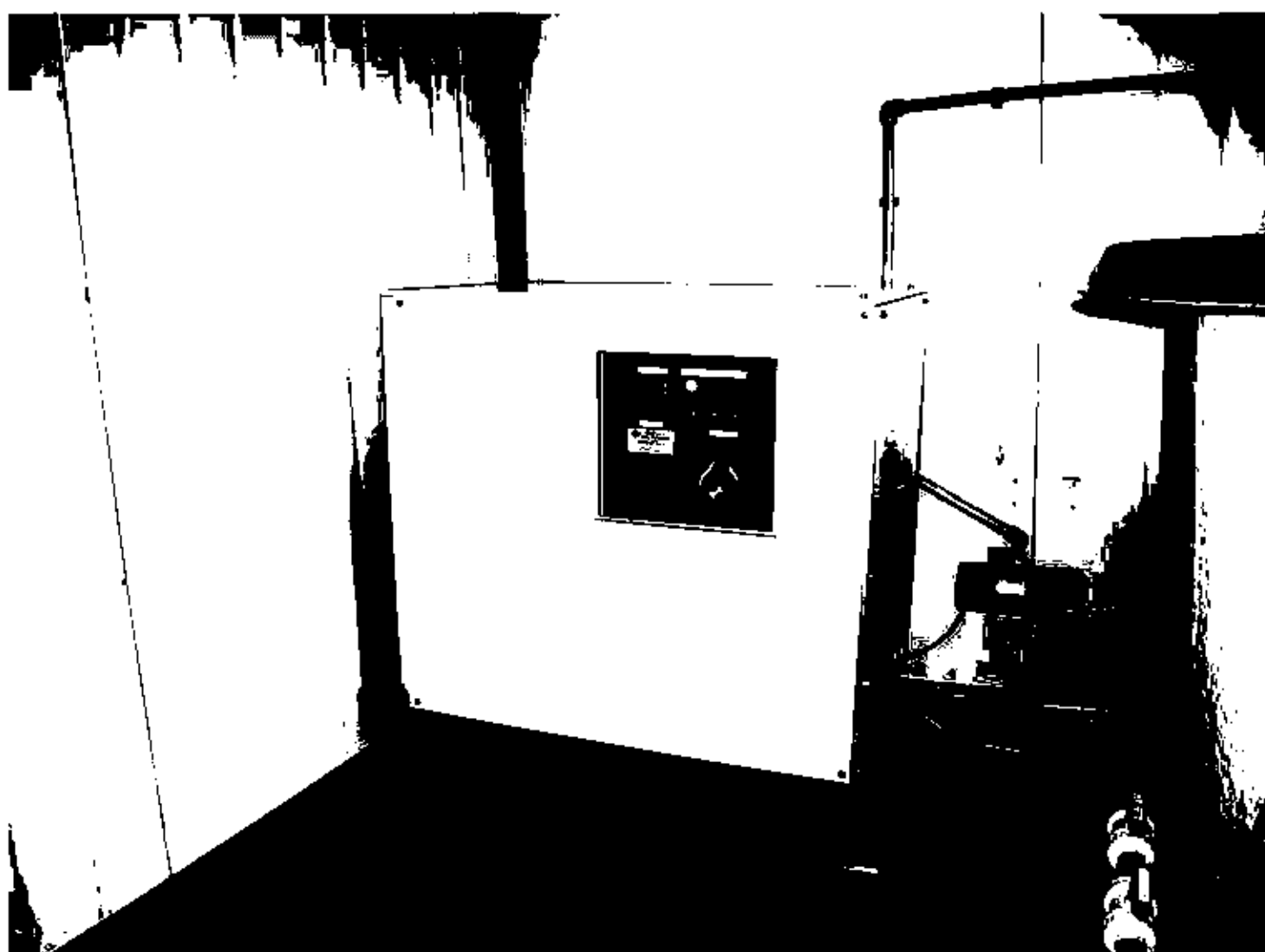


Рис. 32. Агрегат для нагрева-охлаждения морской воды типа WTCA

Для содержания производителей трепанга используются сосуды (бассейны), изготовленные из нейтральных материалов: стекла, пищевого полиэтилена, капрона, поликарбоната, фторопласта или цемента, покрытого эмалью. Конструкция сосудов должна предусматривать наличие проточной системы водообмена и аэрирования воды.

В бассейнах с производителями должен быть как приток свежей воды, обеспечивающей удаление продуктов жизнедеятельности, так и равномерный водообмен или перемешивание воды по всему объему. Водообмен должен составлять не менее 6 объемов. Кислородный режим обеспечивается аэрацией воды и притоком свежей аэрированной воды. Поэтому отделение нереста целесообразно оборудовать несколькими установками с индивидуальными температурными режимами (не менее 3 установок). Это позволит привозить производителей партиями, в зависимости от потребности и стимулировать нерест производителей также по партиям. Смена воды в установках может производиться периодически или непрерывно.

Отделение личинок. Отделение личинок оборудуется емкостями для инкубации икры и для выращивания личинок (рис. 33). Емкости для инкубации могут быть различных типов, но уровень воды в них не должен превышать 1 м. Емкости целесообразно располагать выше по уровню по сравнению с бассейнами для выращивания молоди. Китайские специалисты рекомендуют разницу в уровнях в пределах 60 см (Суй Силинь, 1990).



Рис. 33. Сосуды для инкубации эмбрионов и выращивания личинок

Во все емкости для выращивания личинок должна подаваться вода с постоянной температурой 21 ± 1 °С и высокой степенью очистки, включая УФ-облучение. В помещении необходимо поддерживать постоянную температуру воздуха на уровне 21–23 °С с помощью кондиционера. Таким образом, даже при небольших протоках будет поддерживаться постоянная температура.

Водообмен на стадии инкубации не производится. На стадии выращивания личинок водообмен составляет до 1 объема в сутки.

В емкостях с личинками должна быть индивидуальная аэрация воды (нужно учесть, что пузырьки воздуха от аэратора могут травмировать личинок).

Поскольку при выращивании личинок требуется освещенность на уровне 400–500 лк над поверхностью воды, то необходимо предусмотреть жалюзи на окнах и искусственное освещение, однако освещенность в помещении не должна превышать 2000 лк.

Отделение молоди. Отделение молоди оборудуется проточными бассейнами, в которые подается морская вода. Конструкция бассейнов может быть любой. Основным требованием является нетоксичность материала, которым покрыта их поверхность. Китайскими специалистами рекомендуется уровень воды в

бассейнах не более 1 м (Суй Силинь, 1990). Наиболее оптимальны пластиковые бассейны, которые достаточно легко мыть и дезинфицировать (рис. 34).



Рис. 34. Бассейн с субстратами для выращивания молоди трепанга

Водообмен в бассейнах должен составлять от 1–2 до 3–5 раз в сутки. Следовательно, система водоподготовки должна обеспечивать требуемые параметры среды при разных уровнях водообмена.

Температурный режим должен поддерживаться на уровне, близком к оптимальному природному (оптимальный диапазон температур от 18 до 22 °C).

Выращивание молоди осуществляется на субстратах различных типов: гофрированные пластины в кассетах (японского или китайского производства) или мягкие сетные субстраты. Субстраты должны размещаться в бассейнах таким образом, чтобы обеспечить движение воды от места подачи к сливу во избежание застойных зон.

Бассейны должны иметь возможность аэрации воды. Китайскими специалистами рекомендуется 1 аэратор на 6 м².

Отделение микроводорослей. Отделение микроводорослей оборудуется культиваторами для содержания культур и выращивания микроводорослей на корм личинкам (см. главу 5). Во все культиваторы подается вода с постоянной температурой и высокой степенью очистки.

Отделение микроводорослей и помещение для хранения маточных культур должны оснащаться системами кондиционирования воздуха (т.е. в этих помещениях должна поддерживаться постоянная температура воздуха на за-

данном уровне в диапазоне от 16 до 18 °С в течение определенного периода времени).

Для интенсификации роста культур необходимо искусственное освещение на уровне 5000–10000 лк.

Объемы выращиваемой культуры зависят от рабочей концентрации и потребности производства. При концентрации клеток на уровне 2 млн/мл объем емкостей для выращивания микроводорослей должен составлять около 1/4 объема бассейнов для выращивания личинок.

Рекомендуемая технологическая схема водоподготовки для малых предприятий (пат. № 2284105). Рекомендуемая технологическая схема водоподготовки типового предприятия приведена на рис. 35. Она включает все ранее описанные элементы.

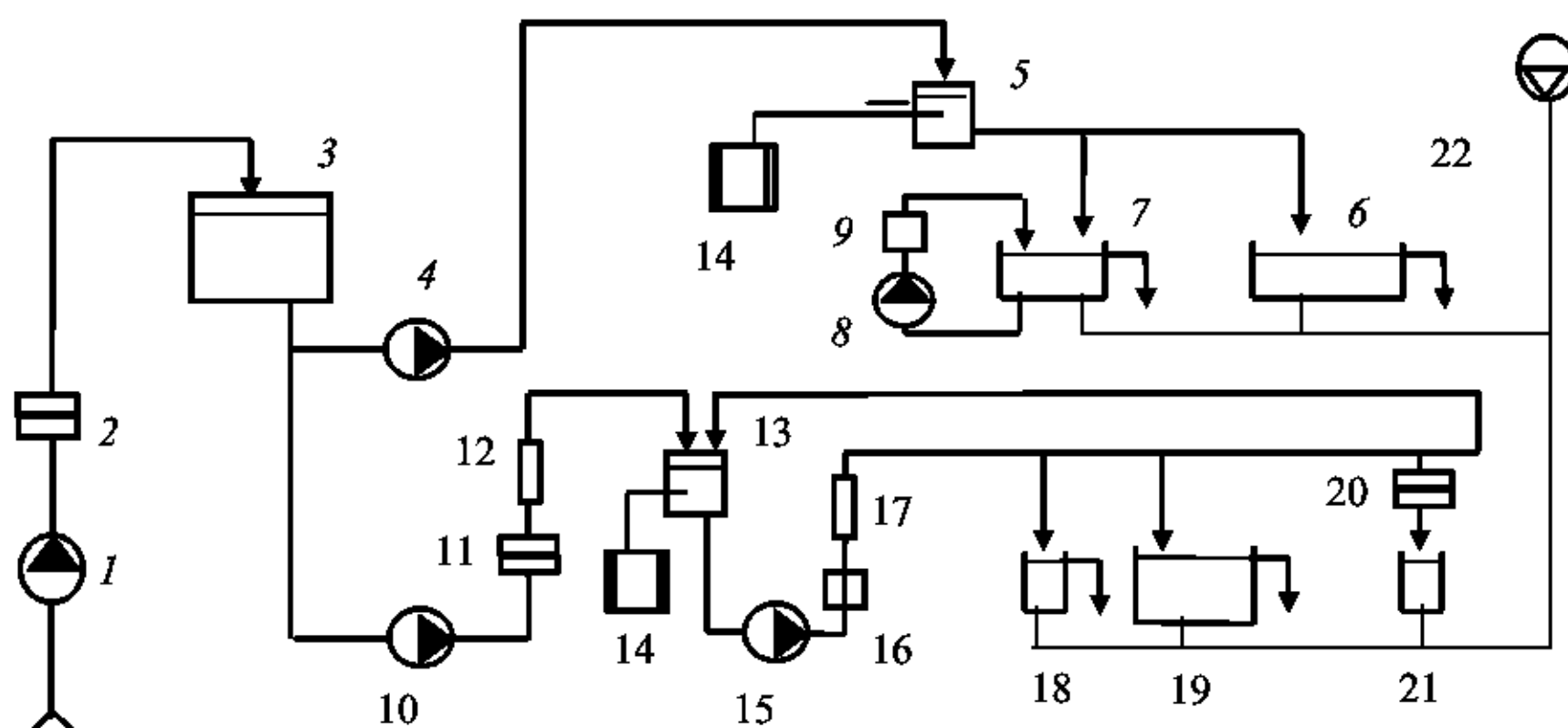


Рис. 35. Принципиальная схема водоподготовки предприятия по выращиванию трепанга: 1 — насосы для забора морской воды; 2 — фильтр; 3 — накопитель-отстойник; 4, 8, 10, 15 — циркуляционные насосы; 5, 13 — расходная емкость; 6 — бассейны для молоди; 7 — бассейны для производителей; 9, 16 — блок термостатирования (нагрев-охлаждение); 11 — микрофильтр; 12, 17 — УФ-облучатель; 14 — терморегулятор с нагревателями; 18 — бассейн для нереста и инкубации икры; 19 — бассейны для личинок; 20 — блок ультрафильтрации воды; 21 — емкости для культивирования корма для молоди трепанга; 22 — воздуходувки

Морская вода забирается насосами (1), проходит через напорный песчано-гравийный фильтр (возможно 2 фильтра механической очистки) и подается в накопитель-отстойник (3), где отстаивается не менее 12 ч. Из накопителя-отстойника вода подается по мере необходимости в напорный бак (5), где нагревается до нужной температуры за счет погружных титановых нагревателей. Далее вода самотеком поступает в бассейны для выращивания молоди (6) и бассейны для выдерживания производителей (7). Последние имеют собственную систему циркуляции и терморегулирования: насос (8) и блок нагрева-

охлаждения морской воды (9). Аэрацию воды в напорном баке и в бассейнах для молоди и для производителей обеспечивают распылители сжатого воздуха, подключенные к воздуходувкам (22), установленным в отделении водоподготовки.

Водоснабжение отделения личинок осуществляется следующим образом. Морская вода забирается из накопителя-отстойника насосом (10) и подается через фильтр тонкой очистки (11) и ультрафиолетовый облучатель (12) в напорный бак (13), предназначенный для краткосрочного хранения отфильтрованной и обеззараженной воды со стабильной температурой на уровне 21 ± 1 °С. Нагрев воды до нужной температуры производится за счет погружных титановых нагревателей (14). Поскольку для выращивания личинок необходимо достаточно точное регулирование температуры воды, применен циркуляционный контур, включающий насос (15), блок нагрева-охлаждения морской воды (16), ультрафиолетовый облучатель (17) и система трубопроводов с кранами, обеспечивающими подачу воды в бассейны для нереста (18) и для выращивания личинок (19).

Для аэрации воды во всех бассейнах используются система трубопроводов и воздуходувки, установленные в отделении водоподготовки.

Вода подаваемая в отделение выращивания микроводорослей проходит еще одну стадию очистки (20) до 0,01 мк (включает ряд фильтров от 1,0 и 0,01 мк). Далее вода поступает в накопитель, где 1–3 раза нагревается до 80 °С и охлаждается до 20 °С. На этой воде выращиваются микроводоросли (21).

Для предприятий с большим водопотреблением и особенно при круглогодичной работе потребуются большие затраты тепла на подогрев воды. Более того, температура сбрасываемой воды будет выше забираемой. Разность температур в зимний период будет превышать 15 °С. Следовательно, на каждом кубическом метре воды будет теряться до 15 тыс. ккал (или 17,44 кВт/ч) тепла. Даже при расходе воды в 100 м³/сут потери составят 15000 ккал, или 17440 кВт/ч. Поэтому для таких предприятий необходимо в схему включать рекуперацию тепла.

Эксплуатация системы водоснабжения предприятия должна осуществляться в соответствии с инструкцией по эксплуатации и регламентом обслуживания оборудования. Инструкцией определяются правила эксплуатации оборудования от запуска до остановки. Регламент обслуживания определяет периодичность и объем выполнения профилактических работ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Временная инструкция по биотехнологии заводского способа получения и выращивания личинок трепанга до стадии оседания / Н.Д. Мокрецова, Г.С. Гаврилова, С.Ф. Авраменко. — Владивосток : ТИНРО, 1988. — 47 с.

Временная инструкция по биотехнологии заводского способа получения и выращивания молоди дальневосточного трепанга. — Владивосток : ТИНРО-центр, 2003. — 49 с.

Гайко Л.А. Марикультура: прогноз урожайности с учетом влияния абиотических факторов : монография. — Владивосток : Дальнаука, 2006. — 204 с.

Галышева Ю.А., Нестерова О.В., Гришан Р.П. Гранулометрический состав и органическое вещество мягких осадков некоторых прибрежных морских экосистем северо-западной части Японского моря // Изв. ТИНРО. — 2008. — Т. 154. — С. 103–113.

Инструкция по мойке и профилактической дезинфекции на предприятиях мясной и птицеперерабатывающей промышленности. — М. : ВНИИМП, 1985. — 36 с.

Инструкция по санитарной обработке технологического оборудования на рыбообрабатывающих предприятиях и судах. — Л. : Транспорт, 1985. — 32 с.

Касьянов В.Л. Связь сроков размножения двустворчатых моллюсков и иглокожих с динамикой абиотических факторов среды в заливе Восток Японского моря // Биол. моря. — 1991. — № 3. — С. 102–105.

Касьянов В.Л., Медведева Л.А., Яковлев Ю.М., Яковлев С.Н. Размножение иглокожих и двустворчатых моллюсков : монография. — М. : Наука, 1980. — 204 с.

Курганов А.М., Федоров Н.Ф. Гидравлические расчеты систем водоснабжения и водоотведения : справочник. 3-е изд., пер. и доп. — Л. : Стройиздат, 1986. — 440 с.

Мокрецова Н.Д. Биология размножения трепанга как основа биотехники его разведения : автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Владивосток : Биол.-почв. ин-т ДВНЦ АН СССР, 1978. — 23 с.

Родионова Т.А., Шеховцова Н.В., Николаев Ю.А., Паников Н.С. Рост и обратимая адгезия *Bacillus lichemformis* 603 в зависимости от условий культивирования // Микробиология. — 2003. — Т. 72, № 4. — С. 521–527.

Справочная книжка энергетика. 2-е изд. — М. : Энергия, 1972. — 424 с.

Суй Силинь. Разведение и вскармливание трепанга : монография. — Пекин : Изд-во «Сельское хозяйство», 1990. — 288 с. (Пер. с кит.)

Хотимченко Ю.С., Деридович И.И., Мотавкин П.А. Биология размножения и регуляция гаметогенеза и нереста у иглокожих : монография. — М. : Наука, 1993. — 167 с.

Aquaculture System. Catalog EARTH CORPORATION. — Tokyo, Japan, 2003. — 36 p.

Eeckhaut I., Parmentier E., Becker P. et al. Parasites and biotic diseases in field and cultivated sea cucumbers // Advances in sea cucumber aquaculture and management : FAO Fisheries technical paper. — 2004. — № 463, session III. — P. 311–326.

Hamel J.-F., Conand C., Pawson D., Mercier A. The sea cucumber *Holothuria scabra* (Holothuroidea: Echinodermata): its biology and exploitation as beche-de-mer // Advances in Marine Biology. — 2001. — № 41. — P. 129–223.

Huan Deng, Zun-chun Zhou, Nian-bin Wang, Chang Liu. The syndrome of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) infected by virus and bacteria // Virologia Sinica. — 2008. — Vol. 23(1). — P. 63–67.

Liu X., Gu B.X., Zhang X.L. Several problems in seed-rearing of *Apostichopus japonicus* (Selenka) and corresponding activities // Modern Fisheries Information. — 2002. — № 17(11). — P. 26–27.

Mitsukuri K. Notes on the habits and life history of *Stichopus japonicus* Selenka // Annot. Zool. Japan. — 1903. — Vol. 5. — P. 1–21. (Яп.)

Morgan A.D. Aspects de l'age des stocks géniteurs d'holothuries de sable (Echino-derme: Holothurides) // Secrétariat général de la Communauté du Pacifique: La Beche-de-mer: Bulletin d'information. — 2000. — № 13. — P. 2–8.

Purcell S., Eeckhaut I. An external check for disease and health of hatchery-produced sea cucumbers // PC Beche-de-mer Inform. Bull. — 2005. — № 22 — P. 35–38.

Wang Yin-Geng, Zhang Chun-Yun, Rong Xiao-Jun et al. Diseases of cultured sea cucumber, *Apostichopus japonicus*, in China // Advances in sea cucumber aquaculture and management : FAO Fisheries technical paper. — 2004. — № 463, session 3. — P. 297–310.

Zhang Q., Liu Y.H. Aquaculture techniques of sea cucumber and sea urchin. — The Press of Ocean University of Qingdao, Qingdao, 1998. — 119 p.

Микроводоросли, используемые для кормления личинок трепанга

Phaeodactylum tricornutum относится к классу Bacillariophyceae, порядку Phaeophyta, семейству Phaeodactylaceae, роду Phaeodactylum. Феодактилум, в просторечии «бурый палец», представляет собой одноклеточную диатомовую морскую водоросль. Имеет форму тройного развилка, длина каждой развилки 6–8 мкм. Обычно делится на две одинаковые по форме клетки. Предпочитает соленость 9–92 ‰, наиболее комфортная — 18–61 ‰. Растет при температуре 18–38 °С, оптимальная — 20 °С.

У *Ph. tricornutum* (рис. 1) малые размеры, слабая жизнестойкость, они разрастаются до больших плотностей и покрывают большие площади. Эти виды хорошо захватываются и перевариваются личинками трепанга.



Рис. 1. *Phaeodactylum tricornutum*

Культура феодактилума имеет более высокие адаптационные возможности при хранении в различных условиях. Установлено, что 10 %-ная концентрация глицерина оптимальна при хранении культур исследованных водорослей. Температура +8 °С и кратковременное освещение способствуют лучшему сохранению культуры феодактилума. Удельная скорость роста после 450 сут хранения в этих условиях остается на высоком уровне. Добавка глицерина увеличивает срок хранения феодактилума при температурах –5 и +22 °С; при +8 °С эффект этого фактора увеличивает жизнеспособность только при наличии кратковременного освещения.

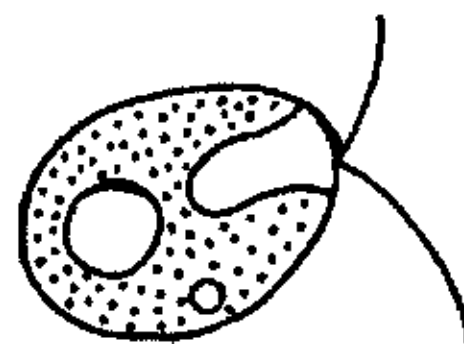
Для хранения феодактилума при отрицательных температурах лучше использовать добавки диметилсульфоксида до 1 % и глицерина до 10 %.

Возраст культуры сказывается на сроке хранения феодактилума, с увеличением возраста срок хранения уменьшается.

Dunaliella salina Teod относится к классу Euchlorophyceae (или Izocontae), порядку Volvocales, семейству Polyblepharidaceae, роду Dunaliella Teod.

Представители рода *Dunaliella* Teod (рис. 2) лишены плотной оболочки, поэтому хорошо перевариваются и усваиваются беспозвоночными. Клетки снабжены жгутиками, подвижны, долго не оседают.

Рис. 2. *Dunaliella salina* Teod



D. salina по пищевым качествам не уступает, а в ряде случаев даже превосходит другие зеленые водоросли. Она характеризуется высоким содержанием белка, жиров и витаминов, полным набором аминокислот и низкой зональностью. Упомянутые свойства клеток *Dunaliella* делают ее перспективным организмом для практического использования: 1) в рыбном хозяйстве в качестве корма для промышленно ценных рыб и моллюсков; 2) в витаминной промышленности для получения каротина (его содержание в клетках *D. salina* может достигать 11000 мг/кг сухого вещества); 3) в бальнеологии для ускорения процессов регенерации лечебной грязи в естественных и искусственных условиях.

Оптимальная температура для размножения *D. salina* 20–25 °С. Культура *D. salina* растет в широком диапазоне концентраций NaCl (до 30 г/л), способна использовать мочевины и нитраты как источники азота, положительно реагирует на повышение интенсивности света в пределах 20–175 Вт/м².

Chaetoceros sp. относится к типу Bacillariophyta (Diatomeae), классу Centriceae, порядку Discinales, семейству Chaetoceraceae, роду *Chaetoceros* sp.

Семейство хетоцеровые (Chaetoceraceae), наряду с вымершими родами, содержит большой род хетоцерос (*Chaetoceros*), хорошо представленный в современной флоре. Клетки низкоцилиндрические, соединенные в цепочки, реже одиночные. Вставочные ободки наблюдаются у единичных видов. Створки эллиптические, реже почти круглые, плоские, выпуклые или вогнутые, редко одна створка выпуклая, вторая вогнутая или плоская. Загиб створки высокий или низкий, часто на границе с пояском с более или менее заметной бороздкой. От полюсов створки отходит по одной тонкой длинной щетинке, иногда щетинки более или менее сдвинуты к середине створки. С помощью этих щетинок клетки соединяются в цепочки. При этом одноименные щетинки створок смежных клеток в цепочке соприкасаются одна с другой, изгибаются и скрепляются, часто срастаясь в месте соприкосновения. Скрепление щетинок происходит или у самого основания щетинок, или на некотором расстоянии от него, в последнем случае часть щетинки, ниже места скрепления, называется основанием или базальной частью щетинки, а остальная ее часть — внешней частью. После скрепления щетинки направляются наружу цепочки перпендикулярно к оси цепочки или под определенным углом к ней. Конечные щетинки цепочки

очень часто отличаются от прочих длиной, толщиной и направлением. Отверстия между смежными створками в цепочке называются окнами. Очертания окон бывают различные: круглые, овальные, узкие в виде щели, — редко створки прилегают плотно одна к другой, тогда окна совсем отсутствуют. Цепочки бывают прямые, реже скрученные вокруг своей оси. Цепочки, состоящие из эллиптических клеток, ложатся в препарате широкой стороной к наблюдателю, так называемой фронтальной стороной, а узкая их сторона называется боковой стороной. Ширина фронтальной стороны цепочки равна длине створки, а ширина боковой стороны равна ее ширине.

Структура створки чрезвычайно мелкая и нежная, с помощью светового микроскопа невидимая. Хроматофоры характерны для отдельных видов, они бывают в виде крупных пластинок, от одной до нескольких в клетке, или в виде многочисленных мелких зерен. У видов, имеющих полые щетинки, зернистые хроматофоры заходят в последние.

Покоящиеся споры известны почти у всех неритических видов. Их форма и структура являются одним из наиболее постоянных и характерных признаков вида. Возникновению споры обыкновенно предшествует деление клетки на две дочерние, и в последних одновременно образуется по одной споре, которые по форме и положению всегда зеркально симметричны. Спора имеет две створки, которые образуются последовательно. Первой по времени возникает створка, расположенная под эпитекой материнской клетки, она называется первичной створкой споры, затем возникает створка под гипотекой клетки, которая называется вторичной створкой. Форма и структура обеих створок большей частью различная. Первичная створка обычно более выпуклая, покрытая шипиками, а вторичная более плоская, с менее выраженными шипиками или гладкая. Обе створки соединяются своими краями, при этом первичная створка охватывает своим загибом вторичную. Поясок у них отсутствует. При прорастании споры дают ауксоспору, прорастающую обычным путем.

Размеры *Chaetoceros muelleri* (рис. 3) малы, плавучесть хорошая, клеточная мембрана тонкая. Личинка очень хорошо захватывает и переваривает эту водоросль. Благоприятная для размножения температура 18–28 °С.

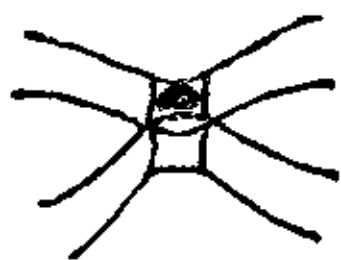


Рис. 3. *Chaetoceros muelleri*, увеличение в 2,5 тыс. раз



Определение концентрации клеток водорослевой культуры с помощью КФК

1. Колориметр включить в сеть за 15 мин для начала измерений. Во время прогрева кюветное отделение должно быть открыто.
2. Ввести цветной фотофильтр с длиной волны 540 нм.
3. Ручку ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ установить в положение «1» в черном делении шкалы, ручку УСТАНОВКА 100 ГРУБО — в крайнее левое положение.
4. В кюветное отделение поместить 2 кюветы одинакового размера: одну с исследуемой суспензией микроводорослей, другую — с контрольным раствором (рабочий раствор среды F).
5. В световой пучок поместить кювету с контрольным раствором — рабочим раствором среды F.
6. Закрыть крышку кюветного отделения.
7. Ручками ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ, УСТАНОВКА 100 ГРУБО и ТОЧНО установить отсчет 100 по шкале колориметра. Ручка ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ может находиться в одном из трех положений: «1», «2» или «3».
8. Кювету с контрольным раствором поворотом ручки заменить кюветой с исследуемой суспензией микроводорослей.
9. Снять показания по шкале D в единицах оптической плотности.
10. С помощью калибровочного графика найти, какому значению концентрации культуры микроводорослей соответствует полученное значение оптической плотности.

Для культуры *Dunaliella salina* используют кюветы шириной 5,072 мм, *Phaeodactylum tricornutum* — 3,040 мм, *Nitzschia closterium* — 10,065 мм.

Для построения калибровочного графика следует провести не менее 5 измерений оптической плотности суспензии микроводорослей с заранее известной концентрацией клеток. Далее построить график зависимости оптической плотности от концентрации клеток микроводорослей, для этого по линии X откладывают значения оптической плотности суспензии микроводорослей, а по оси Y — значения концентрации клеток микроводоросли.

Определение объема суспензии микроводорослей, необходимого для ежедневного кормления заданной численности личинок трепанга

В основу расчета заложено количество потребленных клеток микроводорослей одной личинкой трепанга.

Экспериментами по определению количества потребленных одной личинкой микроводорослей прямым подсчетом было определено, что нормально развивающаяся особь может потребить от 55 до 122 кл./ч. Для 10 млн личинок этот показатель составляет $1320-2928 \cdot 10^7$ кл./сут. Поскольку в первые 8 дней основным кормом для личинки является *Dunaliella salina* и *Chaetoceros muelleri*, то получаем, что при кормлении только видом *D. salina* требуется 30,0 л/сут (1 млн кл./мл), при кормлении двумя видами *D. salina* и *Ch. muelleri* в соотношении 1 : 1 требуется 7,5 л/сут (3 млн кл./мл) *Ch. muelleri* и 15,0 л/сут (1 млн кл./мл) *D. salina*. Если использовать концентрации 1 млн кл./мл для *Dunaliella* и 3 млн кл./мл для *Chaetoceros*.

В последующие 12 сут для кормления используют 3 вида микроводорослей: *D. salina*, *Ch. muelleri* и *Phaeodactylum tricornutum* в соотношении 1 : 1 : 1. В этот период в сутки требуется 2 л *Ph. tricornutum* при концентрации 5 млн кл./мл, 10 л *D. salina* и 4 л *Ch. muelleri*.

В качестве примера приводим вариант режима культивирования микроводорослей для кормления 12,5 млн личинок трепанга.

НПЦМ «Заповедное» для культивирования микроводорослей, используют восемь 30-литровых фотореакторов в одном цикле. В каждом фотореакторе выращивается 20 л суспензии микроводорослей. Режим культивирования микроводорослей организован таким образом, чтобы была возможность использовать для кормления личинок ежедневно 40 л суспензии *D. salina*, 20 л суспензии *Ch. muelleri* и 20 л суспензии *Ph. tricornutum*. Культивирование микроводорослей в каждом цикле проводят в течение 6 сут. Суспензии микроводорослей для кормления используют на 5- и 6-е сут после начала цикла культивирования (см. прил. 2).

ПРИЛОЖЕНИЕ 5

Таблица 1
Оценка объемов сосудов, расхода морской воды и количества кормов, необходимых для выращивания жизнестойкой молоди трепанга

Этап		Необходимое количество, тыс. экз.	Объем сосудов, м ³	Площадь субстратов, м ²	Проток, объемов/сут	Расход воды в сут, м ³	Расход корма в сут	Продолжительность, сут	Расход воды всего, м ³	Расход корма всего
Работы с производителями	Транспортировка	0,034*/0,017**	0,07	—	—	—	—	—	—	—
	Адаптация		0,4	—	3	1,2	—	2	2,4	—
Культивирование эмбрионов		13158	11	—	—	11	—	1	11	—
Культивирование личинок		12500	12,5	—	1	12,5	10–25***	22	275	См. табл. 2 прил. 5
Выращивание осевшей молоди		1250	52	2083	1	52	780–5000	100	10000	200–250
Выращивание жизнестойкой молоди		1000	100	4000	1	100	Г****			

* Всего, при соотношении полов 1 : 1.
** Самок, при рабочей плодовитости 2 млн кл. и доле зрелых ооцитов (свыше 140 мкм) 40 %.
*** Тис. кл./мл объема сосудов, в зависимости от стадии и количества оставшегося в сосуде корма.
**** В зависимости от размеров, плотности посадки молоди и количества оставшегося в сосуде корма.

Таблица 2

Количество суспензии микроводорослей для кормления 12,5 млн личинок трепанга
и основных расходных материалов для их выращивания

Расчетная концентрация микроводорослей в суспензии	D.s.* (1 млн кл./мл)	Ch.m.** (3 млн кл./мл)	Ph.tr.*** (5 млн кл./мл)
1. Содержание коллекционных (музейных) культур, л	15	5	5
2. Наращивание промежуточной культуры, л	150	50	50
3. Массовое культивирование микроводорослей, л	1500	500	500
4. Пробные циклы, л	300	150	150
Всего, л	1965	705	705
Расход концентрированных растворов реактивов — компонентов питательной среды Гольдберга, л	2		
Расход концентрированных растворов реактивов — компонентов питательной среды «F/2», л	1,5		
Расход морской воды, л	4000		
Расход пресной воды, л	8500		

* *Dunaliella salina*.

** *Chaetoceros muelleri*.

*** *Phaeodactylum tricornutum*.

Таблица 3

Необходимое количество химреактивов для приготовления
концентрированных растворов — компонентов питательных сред
для выращивания 12,5 млн личинок трепанга

Наименование реактива	Масса, г
KNO ₃	202,0
Na ₂ HPO ₄	18,42
NaNO ₃	112,50
NaH ₂ PO ₄	7,50
Na ₂ SiO ₃ 9H ₂ O	45,0
Трилон Б ЕДТА-Na ₂	6,55
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,015
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,033
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,50
MnCl ₂ 4H ₂ O	0,67
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,009
FeCl ₃ 6H ₂ O	5,30

ПРИЛОЖЕНИЕ 6

Перечень материалов и оборудования для культивирования микроводорослей

№ позиции	Наименование оборудования	Марка	Единица измерения	Количество	Примечание
<i>Маточная комната</i>					
1.	Микроскоп	Ломо Микмед-5	Шт.	1	Объективы увел. 10, 40, 100
2.	Шкаф стеклянный		Шт.	1	
3.	Термолюминостат		Шт.	4	
4.	Весы электронные		Шт.	1	До 0,001 г
5.	Кондиционер		Шт.	1	
6.	Шкаф для хранения реактивов и химпосуды		Шт.	2	
7.	Холодильник бытовой		Шт.	1	200 л
8.	Стол лабораторный		Шт.	1	
9.	Стол		Шт.	1	
10.	Мойка для химпосуды		Шт.	1	
11.	Сушилка для химпосуды		Шт.	1	
12.	Стеллаж для водорослей стеклянный	Самодельный	Шт.	1	
13.	Фотоэлектроколориметр	КФК 2	Шт.	1	
14.	УФ-облучатель помещения стационарный		Шт.	1	
15.	УФ-облучатель помещения переносной		Шт.	1	
16.	Спиртовая горелка		Шт.	2	
17.	Камера Горяева		Шт.	3	
18.	Стекля покровные		Уп.	5	
19.	Стекля предметные		Уп.	10	
20.	Фильтры обеззоленные		Уп.	50	Диаметр 15 см
21.	Колбы Эрленмейера	ТС	Шт.	100	500 мл
22.	Колбы Эрленмейера	ТС	Шт.	100	2000 мл
23.	Колбы Эрленмейера	ТС	Шт.	100	6000 мл
24.	Стаканы	ТС	Шт.	10	150 мл
25.	Стаканы	ТС	Шт.	10	250 мл

[illegible]

№ позиции	Наименование оборудования	Марка	Единица измерения	Количество	Примечание
38.	Автоклав (или сухожаровый шкаф)		Шт.	1	
39.	Стол лабораторный		Шт.	2	
40.	Стол		Шт.	2	
41.	Мойка для химпосуды		Шт.	1	
42.	Сушилка для химпосуды		Шт.	1	
43.	Шкаф для хранения оборудования		Шт.	2	
44.	Термометр для воды		Шт.	5	До 100 °С
45.	Термометр для воды		Шт.	12	До 50 °С
46.	Термометр неконтактный (пирометр)		Шт.	3	
47.	Распылитель аквариумный		Шт.	200	Или по количеству емкостей
48.	Плита 2-конфорочная		Шт.	3	
49.	Емкости для выращивания микроводорослей		Шт.	24	Объем 100, 500 или 1000 л
50.	Стеллаж металлический	Собственного производства	Шт.	4	
51.	Ведро пластиковые		Шт.	10	Объем 15 л
52.	Таз пластиковый		Шт.	6	
53.	Ковш пластиковый		Шт.	6	
54.	УФ-облучатель помещения стационарный		Шт.	1	
55.	УФ-облучатель помещения переносной		Шт.	1	
56.	Расходные материалы (сетки, марля и др.)		Шт.	По необходимости	
Лаборатория					
57.	Микроскоп		Шт.	1	
58.	Микроскоп с приставкой для фотографирования или цифровой камерой		Шт.	1	
59.	Биноклярный микроскоп		Шт.	2	
60.	Мойка для химпосуды		Шт.	1	
61.	Сушилка для химпосуды		Шт.	1	
62.	Сухожаровый шкаф		Шт.	1	
63.	Шкаф для хранения реактивов и химпосуды		Шт.	2	
64.	Шкаф для одежды		Шт.	1	

№ позиции	Наименование оборудования	Марка	Единица измерения	Количество	Примечание
65.	Аквадистиллятор		Шт.	1	Не менее 10 л/ч — 1 шт.
66.	Компьютер		Шт.	2	
67.	Принтер лазерный		Шт.	2	
68.	Стол компьютерный		Шт.	1	
69.	Стол лабораторный		Шт.	2	
70.	Стол		Шт.	2	
71.	Камера Богорова		Шт.	3	
72.	Весы электронные		Шт.	2	До 5 кг, точность 0,1 г
73.	Ларь морозильный 400 л		Шт.	1	
74.	Холодильник		Шт.	2	
75.	Термос-сумка (переносной контейнер)		Шт.	2	
76.	Прибор для определения солености воды		Шт.	2	
77.	Пинцеты		Уп.	5	
78.	Ножницы		Шт.	10	
80.	Препаровальные иглы		Уп.	10	
81.	Кондиционер		Шт.	1	

Производственно-практическое издание

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ
ЖИЗНЕСТОЙКОЙ МОЛОДИ ТРЕПАНГА В ЗАВОДСКИХ УСЛОВИЯХ**

Редактор Н.С. Самойлова
Корректор К.В. Руденко
Компьютерная верстка О.В. Степановой

Подписано в печать 15.03.12 г. Формат 16х84/16. Усл. печ. л. 5,1. Уч.-изд. л. 4,7.
Тираж 100. Заказ № 18.

Отпечатано в типографии ТИНРО-Центра
г. Владивосток, ул. Западная, 10