



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014119107/13, 12.05.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
12.05.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 12.05.2014

(45) Опубликовано: 27.10.2015 Бюл. № 30

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: UA80385C2, 10.09.2007. RU2537547C1,
10.01.2015. RU2536633C1, 27.12.2014

Адрес для переписки:

690087, г. Владивосток, ГСП, ул. Луговая, 52-Б,
ФГБОУ ВПО "Дальрыбвтуз", Отдел по охране
интеллектуальных прав, Первунинской Т.А.

(72) Автор(ы):

Ким Георгий Николаевич (RU),
Журба Елена Константиновна (RU),
Калинина Галина Георгиевна (RU),
Советкина Анна Сергеевна (RU),
Азьмука Татьяна Михайловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования
"Дальневосточный государственный
технический рыбохозяйственный
университет" (ФГБОУ ВПО "Дальрыбвтуз")
(RU)

**(54) СПОСОБ ПОДГОТОВКИ КОРМОВ ИЗ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ДЛЯ ЛИЧИНОК
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ТРЕПАНГА**

(57) Реферат:

Изобретение относится к аквакультуре. Способ включает круглогодичное культивирование на питательной среде, приготовленной на основе природной морской воды соленостью 31%, альгологически чистых монокультур микроводорослей *Dunaliella salina* и *Chaetoceros muelleri*, которое осуществляют в два этапа. На первом этапе наращивают биомассу водорослей и проводят отбор наиболее

жизнеспособных монокультур, которые инокулируют отдельно в светопроницаемые культуральные емкости на модифицированную питательную среду Уолна. На втором этапе полученные биомассы монокультур каждые 4 дня порционно кондиционируют путем выращивания на питательной среде Гольдберга. Изобретение обеспечивает получение стабильной плотности микроводорослей. 2 пр., 8 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A23K 1/14 (2006.01)*A23K* 1/18 (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2014119107/13, 12.05.2014

(24) Effective date for property rights:
12.05.2014

Priority:

(22) Date of filing: 12.05.2014

(45) Date of publication: 27.10.2015 Bull. № 30

Mail address:

690087, g.Vladivostok, GSP, ul. Lugovaja, 52-B,
FGBOU VPO "Dal'rybvtuz", Otdel po okhrane
intelektual'nykh prav, Pervuninskoj T.A.

(72) Inventor(s):

**Kim Georgij Nikolaevich (RU),
Zhurba Elena Konstantinovna (RU),
Kalinina Galina Georgievna (RU),
Sovetkina Anna Sergeevna (RU),
Az'muka Tat'jana Mikhajlovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe
obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego
professional'nogo obrazovanija
"Dal'nevostochnyj gosudarstvennyj tekhnicheskij
rybokhozjajstvennyj universitet" (FGBOU VPO
"Dal'rybvtuz") (RU)**

(54) **METHOD OF PREPARATION OF FEED FROM MICROALGAE FOR FAR EASTERN SEA CUCUMBER LARVAE**

(57) Abstract:

FIELD: agriculture.

SUBSTANCE: method comprises year-round cultivation of unialgal monocultures of microalgae *Dunaliella salina* and *Chaetoceros muelleri* on a nutrient medium prepared based on natural sea water with the salinity of 31‰, which is carried out in two stages. At the first stage, the biomass of algae is increased, and the most viable monocultures are selected, which are

inoculated separately into the translucent culture containers on a modified nutrient medium of Waln. At the second stage, the biomass of monocultures obtained are conditioned every 4 days in portions by growing in a nutrient medium of Goldberg.

EFFECT: obtaining of stable density of microalgae.
2 ex, 8 dwg

Изобретение относится к одному из направлений рыбной отрасли, а именно аквакультуре, в частности к культивированию микроводорослей - одноклеточных видов водорослей *Dunaliella salina* и *Chaetoceros muelleri* для использования в качестве живого корма при выращивании дальневосточного трепанга. Изобретение может быть использовано при выращивании дальневосточного трепанга в искусственных условиях.

Важным условием в процессе выращивания личинок трепанга является их кормление живыми кормами. Состав и качество этих кормов существенно влияют на скорость роста личинок и их выживаемость. Поэтому подбор оптимального состава кормов и рациона является первоочередной задачей для воспроизводства дальневосточного трепанга.

Особенную ценность представляют такие одноклеточные организмы как зеленые водоросли *Dunaliella salina* Teod. (Chlorophyta) и диатомовые водоросли *Chaetoceros muelleri* Lemm. (Bacillariophyta), клетки которых имеют подходящие для питания личинок трепанга размеры (8-20 мкм) [1]. В них содержатся практически все незаменимые аминокислоты, жиры, углеводы, много различных витаминов [1-4]. Существенно облегчает усвоение биомассы данных водорослей то, что клетки *D. salina* лишены целлюлозной оболочки и окружены лишь плазмолеммой, а стенки панциря *C. muelleri* очень тонкие, с нежной структурой, благодаря чему применяются в качестве кормовой базы для личинок трепанга.

Для выращивания дальневосточного трепанга необходимым условием является одновременное созревание корма для его личинок, которым являются микроводоросли *D. salina* и *C. muelleri*. А для этого микроводоросли необходимо выращивать одновременно. Поэтому для создания оптимальных условий их роста в условиях аквакультуры необходимо искусственно изменять условия содержания (температуру, освещенность, солевой состав).

Известны работы, в которых даны рекомендации по массовому культивированию микроводорослей. Наиболее значимыми факторами, оказывающими влияние на ростовые и биохимические характеристики культур, являются световое и минеральное обеспечение [5].

Существуют множество отработанных технологий выращивания одноклеточных водорослей. Для их выращивания используют установки открытого и закрытого типов. Водоросли в установках открытого типа выращиваются либо под открытым небом, либо под защитной пленкой, пропускающей ультрафиолетовые лучи. Выращивание без защитной пленки осложняется возможностью заражения водорослей посторонними культурами.

Известен способ культивирования штамма микроводорослей *Chlorella vulgaris* ИФР С-111, предусматривающий розлив питательной среды в емкости, инокуляцию суспензии штаммом, освещение культуральной жидкости в процессе роста микроводорослей и поддержание необходимой температуры суспензии, притом, что емкости представляют собой сосуды из прозрачного материала и для освещения используют источник искусственного света, при этом сосуды размещены на расстоянии один от другого на поддоне каркаса вокруг источника света, к которому установлен на каркасе с возможностью вертикального перемещения к поддону (патент РФ №2176667, МПК С12N 001/12, С12M 003/00, С12M 003/04). Изобретение обеспечивает интенсификацию процесса выращивания микроводорослей с использованием упомянутого выше штамма и получение стабильной плотности клеток за определенный период времени. Согласно информации представленной в описании изобретения, температура суспензии хлореллы в бутылках равняется 30°C (нагрев от лампы) при температуре окружающего воздуха

20°C.

Однако, эти условия являются непригодными для *Dunaliella salina* и *Chaetoceros muelleri*, потому что для последних необходимо регулярное перемешивание, более низкая температура.

5 Известен также способ культивирования микроводорослей с использованием питательных сред, приготовленных на основе сточных вод животноводческих и рыбных ферм (Patentscope, method of cultivating microalgae, SU 01621823, 23.01.1991 (з. №4392268, 15.03.1988).

10 Способ заключается в том, что при культивировании микроводорослей, после инокулирования среды осуществляют выращивание в суспензионной культуре в накопительном режиме в условиях перемешивания и освещения до максимального прироста биомассы. Процесс культивирования проводят в две стадии. На первой стадии культивирование осуществляют до достижения рН в суспензионной культуре 9,4-9,6 и последующего культивирования при данном значении рН, после чего отстаивают 15 суспензию для формирования коллоидно-бактериального осадка, после удаляют образовавшийся осадок и проводят вторую стадию культивирования до максимального прироста биомассы

Недостатком данного способа является большая бактериальная зараженность культуры и невозможность длительного культивирования в связи с последующими 20 процессами гниения за счет нереализованных белковых соединений. Данная технология может использоваться лишь при выращивании сине-зеленых водорослей. Она неприменима для одновременного культивирования *Dunaliella salina* и *Chaetoceros muelleri* из-за высокого уровня рН и присутствия бактерий.

Известен способ непрерывного культивирования микроорганизмов в больших 25 открытых резервуарах в солнечном свете (US 6673592 B1). Открытая система для культивирования микроводорослей включает в себя большой открытый контейнер и неограниченный солнечный свет как источник ультрафиолетового излучения. Контейнер, желателен из стекловолокна, имеет открытый верх, диаметром около 18 дюймов и высотой около 5 метров. Используется питательная среда с рН 8.2. 90% культивируемых 30 микроводорослей каждый день изымается, заменяется новой культурой. Этот способ является малотрудоемким и экономически эффективным.

Однако при его использовании появляется возможность возникновения инфекций, которые могут стать причиной гибели всего объема культуры. Также большим минусом является зависимость от погодных условий.

35 Наиболее близким для культивирования микроводорослей в условиях выращивания дальневосточного трепанга из существующих ныне является способ подготовки кормов для выращивания другого представителя морских беспозвоночных в искусственных условиях, а именно: гигантской устрицы *Crassostrea gigas* в Черном море в условиях питомника (Патент UA 80385, A01K 61/00, A23K 1/18). Способ включает 40 культивирование микроводорослей в накопительном и проточном режимах с применением модифицированной среды Конвея, приготовленной на воде с соленостью выше 40‰, причем на стадии велигера используют микроводоросли, которые культивируют в течение 17-ти дней в накопительном режиме, для стадии великонхи применяют 10-дневные микроводоросли, которые культивируют в проточном режиме 45 и для стадии педивелигера микроводоросли проходят 24-дневное культивирование.

Недостатком данного способа является не только сложность, но и использование для приготовления питательной среды вод гипергалинных озер, соленость которых выше 40‰. Для подготовки кормов из микроводорослей для личинок дальневосточного

трепанга при выращивании трепанга в экологических условиях бухты Северная в Славянском заливе Японского моря на мини-заводе этот способ не пригоден, в том числе в связи с тем, что для *Dunaliella salina* (в требуемой для кормления трепанга «зеленой фазе») и *Chaetoceros muelleri* оптимальна соленость для культивирования 31%.

5 Задача состоит в создании способа подготовки кормов из микроводорослей для личинок дальневосточного трепанга, позволяющего выращивать одновременно микроводоросли *Dunaliella salina* и *Chaetoceros muelleri* и получать монокультуры со стабильной плотностью к началу периода кормления личинок, таким образом обеспечивая одновременное созревание корма.

10 Для решения поставленной задачи в способе подготовки кормов из микроводорослей для личинок дальневосточного трепанга, включающем культивирование альгологически чистых монокультур микроводорослей на питательной среде, приготовленной на основе природной соленой воды, согласно изобретению, в качестве микроводорослей используют одноклеточные водоросли *Dunaliella salina* и *Chaetoceros muelleri*, которые
15 культивируют круглый год в два этапа: на первом подготовительном этапе наращивают биомассу водорослей и проводят отбор наиболее жизнеспособных монокультур, которые инокулируют отдельно в светопроницаемые культуральные емкости на приготовленную на основе природной морской воды соленостью 31% модифицированную питательную среду Уолна, следующего состава, мг/л:

20	ZnCl ₂	0,21
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,3
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,14
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,2
25	FeCl ₃ ·6H ₂ O	1,3
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,36
	H ₃ BO ₃	33,6
	EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ ·2H ₂ O)	45,0
	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	30,0
30	NaNO ₃	100,0
	Na ₂ SiO ₃	5,0

и культивируют при температуре 22°C, рН среды 7,2 при фотопериодичности 18 часов света с освещенностью 30000 люкс и 6 часов темноты, при периодическом перемешивании до плотности 2-2,5 млн кл./мл с последующими пересадками на свежую
35 среду этого же состава, при этом пересадку *Dunaliella salina* проводят каждые 15-20 дней в течение всего подготовительного этапа, а *Chaetoceros muelleri* - каждые 10-15 дней, и только в зимний период этого этапа пересадку проводят каждые 20-25 дней; на втором - кормовом этапе, за 7 дней до нереста трепанга и в течение всего кормового периода личинок трепанга каждые 4 дня полученные биомассы монокультур порционно
40 кондиционируют путем выращивания на приготовленной на основе природной морской воды соленостью 31‰ питательной среде Гольдберга при температуре 22°C, рН среды 7,2 и фотопериодичности 18 часов света с освещенностью 30000 люкс и 6 часов темноты, в светопроницаемых культуральных емкостях при периодическом перемешивании в течение 4-6 суток до плотности 1,0-1,5 млн кл./мл.

45 Технический результат заключается в создании нового способа подготовки кормов из микроводорослей для личинок дальневосточного трепанга, обеспечивающего одновременное созревание *D. salina* и *C. muelleri* ко времени нереста и получение стабильной плотности клеток к периоду кормления личинок трепанга дальневосточного,

путем регулирования частоты пересадки, фотопериодичности, освещения, температуры и солености в культуральных емкостях.

Количество пересадок определяется потребностями завода - производителя.

Процесс культивирования микроводорослей для кормления личинок дальневосточного трепанга осуществляется круглогодично.

На фиг. 1 - графически представлена динамика плотности клеток в культуре *D. salina* в период исследования минерального обеспечения.

На фиг. 2 - графически представлена динамика плотности клеток в культуре *C.muelleri* исследования минерального обеспечения.

На фиг. 3 и фото к фиг. 3 - представлены клетки в культуре *D. salina* (среда Уолна модифицированная).

На фиг. 4 и фото к фиг. 4 - представлена цепочка клеток *C.muelleri* (среда Уолна модифицированная).

На фиг. 5 и фото к фиг. 5 - представлена клетка в культуре *D. salina* (среда Гольдберга).

На фиг. 6 и фото к фиг. 6 - представлена клетка в культуре *C.muelleri* (среда Гольдберга).

На фиг. 7 - графически представлена динамика плотности культуры *D. salina* на среде Уолна (стандартной и модифицированной),

где 1 - стандартная среда Уолна; 2 - модифицированная среда Уолна; 3 - модифицированная среда Уолна с добавлением витаминов.

На фиг. 8 - графически представлено влияние светового периода на плотность клеток в культуре *D. salina*.

Способ осуществляют следующим образом.

Заявляемый способ включает два этапа, связанных с циклом выращиванием дальневосточного трепанга. Первый этап начинается в период оседания трепанга и длится до его преднерестовой стадии.

На первом этапе осуществляется посев жизнеспособных клеток водорослей *Dunaliella salina* и *Chaetoceros muelleri* в разные емкости на одинаковую для обеих культур модифицированную заявителем, приготовленную на основе природной морской воды соленостью 31‰ питательную среду Уолна, следующего состава, мг/л: $ZnCl_2$ - 0.21, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ - 0.3, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ - 0.14, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0.2, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ - 1.3, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ - 0.36, H_3BO_3 - 33.6, EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$) - 45.0, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ - 30.0, $NaNO_3$ - 100.0, Na_2SiO_3 - 5.0 для наращивания биомассы монокультур и длится до начала подготовки биомассы к кондиционированию корма.

На втором этапе полученные в биомассе *Dunaliella salina* и *Chaetoceros muelleri*, которые предназначены быть кормом для личинок трепанга, кондиционируют путем замены питательной среды. Для этого биомассы пересаживают на среду, в составе которой полностью отсутствуют вредные для развития личинок дальневосточного трепанга вещества. Продолжительность второго этапа связана с периодом нереста и личиночного развития дальневосточного трепанга

Обоснование выбора питательных сред на этапах

Эксперимент по подбору питательной среды, оптимальной для роста и развития микроводорослей из разных отделов в течение длительного периода с наращиванием биомассы, проводили в течение 14 дней.

При исследовании были использованы две питательные среды (Гольдберга и модифицированная среда Уолна).

В начальный период эксперимента водоросли в течение 20 суток адаптировали к

задаваемым питательным средам. Перед началом опытов плотность клеточных суспензий во всех колбах была одинаковой. Каждый вариант опыта выполнялся одновременно в трех повторностях, и все приведенные количественные данные являются средними из значений, полученных в каждой параллели.

5 Рост культур *D. salina* и *C. muelleri* на среде Уолна характеризовался S-образной кривой с небольшими изломами (фиг. 1, 2).

Максимальный среднесуточный прирост культуры *D. salina* на среде Уолна зарегистрирован на 6-е сутки. Клетки на протяжении всего эксперимента имели правильную овальную форму (Фиг. 3), активно передвигались. Отрицательный скачок роста наблюдался на стадии экспоненциального роста на 7-е сутки.

10 Максимальный среднесуточный прирост культуры *C. muelleri* на среде Уолна зарегистрирован на 11-е сутки - 1798 тыс кл./мл. Форма клеток оставалась неизменной (прямоугольная). До 10 суток эксперимента преобладали одиночные клетки, далее - сцепленные по 2 и 3 (Фиг. 4). Значительный отрицательный скачок роста наблюдался на 9-е сутки.

Кривая роста культуры *D. salina* на среде Гольдберга имеет множество точек излома (Фиг. 1). Микроводоросли развивались неоднозначно в течение всего эксперимента. Снижение темпа роста и значительная смертность клеток в культуре наблюдается на 5-е и 10-е сутки. Максимальный среднесуточный прирост культуры зарегистрирован на 5-е сутки - 542 тыс кл./мл. Некоторые клетки округлились (Фиг. 5), их движение замедлилось, но на 12-е сутки вытянулись и ускорились.

Кривую роста культуры *C. muelleri* на среде Гольдберга можно охарактеризовать линейной прямой с небольшими отклонениями (Фиг. 2). Максимальный среднесуточный прирост культуры зарегистрирован на 5-е сутки. Форма клеток не изменилась, преобладали одиночные (фиг. 6).

За время эксперимента среднесуточный прирост на среде Уолна составил: $446 \pm 0,19$ млн клеток/сут для *D. salina*, $389 \pm 0,13$ млн клеток/сут для *C. muelleri*; на среде Гольдберга соответственно: $24 \pm 0,15$ млн клеток/сут, $30 \pm 0,24$ млн клеток/сут.

30 Представленные фотографии сделаны автором во время проведения эксперимента цифровым фотоаппаратом Olympus FE 5010 при увеличении $\times 1600$. При выращивании микроводорослей основной целью является сохранение последних в конце экспоненциальной фазы роста, чего мы добились как при использовании питательной среды Уолна, так и Гольдберга.

35 Однако в результате эксперимента выяснилось, что микроводоросли растут быстрее на среде Уолна и медленнее - на среде Гольдберга, причем разница в приросте к концу эксперимента достигла для *D. salina* 11 раз, для *C. muelleri* - 8,8 (табл. 1).

Таблица 1
Рост микроводорослей на двух питательных средах (результат показан на 14-е сутки)

№ п/п	Среда	Концентрация водорослей (млн кл./мл)	
		<i>D. salina</i>	<i>C. muelleri</i>
1	Уолна	6,480	5,680
2	Гольдберга	0,573	0,648

45 Как и ожидалось, среда с самой низкой концентрацией питательных веществ (Гольдберга) показала самую низкую плотность клеток. Вероятно это связано с недостатком в данных средах такого микроэлемента как молибден.

Обоснование выбора модификации питательной среды Уолна

Именно использование среды Уолна при выращивании микроводорослей *D. salina* и *C. muelleri* позволяет в течение длительного времени поддерживать культуру в фазе

активного роста и оптимальной концентрации.

Однако, соотношение азота к фосфору питательной среде - это самостоятельно регулируемый фактор. В стандартную среду Уолна были внесены изменения: концентрация NaH_2PO_4 и увеличены до 30 мг/л. Концентрации $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и

5 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ увеличены до 0,3 и 5 мг/л соответственно. В среду был добавлен Na_2SiO_3 в количестве 5 мг/л. Раствор витаминов был исключен полностью.

Для исследования модифицированной питательной среды Уолна *D. salina* и *S. muelleri* культивировали в течение 8 суток при выбранных концентрациях элементов. Контролем служила стандартная среда Уолна. Также водоросли культивировали на выбранной
10 модификации с добавлением витаминов по стандартной схеме для среды Уолна. Динамика изменений плотности культуры *D. salina* в зависимости от состава среды отображена на фиг. 7.

В первой фазе эксперимента обе модификации показали себя положительно (скачки роста отсутствовали, клетки оставались овальными, подвижными, цисты отсутствовали).
15 На 5 сутки эксперимента инокулят, культивируемый на модифицированной питательной среде Уолна с добавлением витаминов, перешел на фазу отмирания: более 25% клеток погибло и осело на дно колбы.

Модифицированная питательная среда Уолна (без витаминов), напротив, дала
20 прирост на 540 тыс кл./мл выше, чем стандартная среда Уолна.

Эксперимент с *S. muelleri* показал аналогичные результаты. Культивирование *D. salina* и *S. muelleri* в на модифицированной среде Уолна дает большие приросты, чем стандартная.

Обоснование выбора условий освещенности.

25 Влияние светового периода на плотность клеток в культуре отражено на фиг. 8

D. salina Культуру *D. salina* выращивали в течение 10 дней при различном световом обеспечении: при круглосуточном освещении в 30000 люкс и при фотопериодическом освещении с продолжительностью светового периода 18 часов при освещенности 30000 люкс.

30 Начальная плотность культур во всех вариантах эксперимента была одинаковой и соответствовала 240 тыс кл./мл. Каждый вариант опыта выполнялся одновременно в двух повторностях, и все приведенные количественные данные являются средними из значений, полученных в каждой параллели.

Кривая роста культуры *D. salina* при круглосуточном освещении имеет множество
35 точек излома (Фиг. 8). Микроводоросли развивались неоднозначно в течение всего эксперимента. Снижение темпа роста и значительная смертность клеток в культуре наблюдается на 4, 7 и 8 сутки. Максимальный среднесуточный прирост культуры зарегистрирован на 3-е сутки - 820 тыс кл./мл. Многие клетки округлились, их движение замедлилось, на 10-е сутки появились цисты.

40 Рост культуры *D. salina* при фотопериодическом освещении характеризовался S-образной кривой с небольшими изломами.

Максимальный среднесуточный прирост культуры *D. salina* при фотопериодическом освещении зарегистрирован на 10-е сутки - 2450 тыс кл./мл. Клетки на протяжении
45 всего эксперимента имели правильную овальную форму, активно передвигались. Отрицательный скачок роста наблюдался на стадии экспоненциального роста на 8-е сутки.

За время эксперимента среднесуточный прирост *D. salina* в контрольном образце составил 446 млн кл./сут для, в опытном - 38 млн кл./сут.

Обеспечение световой энергией является основным фактором, влияющим на синтез биомассы клетками микроводорослей. На примере различных видов морских и пресноводных микроводорослей было показано, что длительность фотопериода оказывает влияние на интенсивность фотосинтеза, продуктивность, скорость деления 5 клеток, потребление углекислого газа. Практически всегда перечисленные показатели при различных светотемновых режимах были выше, чем при непрерывном режиме освещения [6].

В результате эксперимента выяснилось, что культура микроводоросли *D. salina* растет быстрее при фотопериодическом режиме освещения и медленнее - при постоянном 10 освещении, причем разница в приросте к концу эксперимента достигла 4,5 раза (табл.2). Предположительно, это обусловлено возрастанием концентрации углерода в опытном образце в течение темного периода за счет темного дыхания клеток.

15

Таблица 2 Рост микроводорослей <i>D. salina</i> при различном освещении. (результат показан на 10-е сутки)		
№ п/п	Образец	Концентрация клеток <i>D. salina</i> в конце эксперимента (млн кл./мл)
1	Контрольный	0,63±0,021
2	Опытный	2,840±0,14

20 Культивирование *D. salina* в фотопериодическом режиме позволяет в течение длительного времени поддерживать культуру в фазе активного роста и оптимальной концентрации.

Динамика прироста в эксперименте с культурой *S. muelleri*, выращенной в течение 10 дней при различном световом обеспечении: при круглосуточном освещении в 30000 люкс и при фотопериодическом освещении с продолжительностью светового периода 18 часов при освещенности 30000 люкс, показала результаты, аналогичные с 25 полученными при культивировании *D. salina*, отраженными на фиг. 8.

30 Экспериментальные исследования выполнены заявителем на мини-заводе Научно-производственного департамента марикультуры ФГБОУ ВПО «Дальрыбвтуз» в условиях бухты Северной Славянского залива Японского моря, где первый этап длится от 9 до 10 месяцев в зависимости от климатических условий (август/сентябрь-май), а второй этап длится 2-3 месяца (июнь-июль/август), включает начало преднерестового периода трепанга, период кормления и до окончания кормления личинок трепанга, т.е. до оседания.

Культивирование на ПЕРВОМ ЭТАПЕ.

35 Для культивирования микроводорослей на первом этапе используют модифицированную заявителем приготовленную на основе природной морской воды соленостью 31‰ питательную среду Уолна следующего состава, согласно таблице 3. В таблице для информации указан состав стандартной среды Уолна.

40

45

Таблица 3

Компоненты	Модифицированная заявитель среда Уолна, мг/л	Стандартная среда Уолна, мг/л
ZnCl ₂	0,21	0,21
CoCl ₂ • 6H ₂ O	0,3	0,2
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ • 4H ₂ O	0,14	0,09
CuSO ₄ • 5H ₂ O	0,2	0,2
FeCl ₃ • 6H ₂ O	1,3	1,3
MnCl ₂ • 4H ₂ O	0,36	0,36
H ₃ BO ₃	33,6	33,6
EDTA(C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ • 2H ₂ O)	45,0	45,0
NaH ₂ PO ₄ • 2H ₂ O	30,0	20,0
NaNO ₃	100,0	100,0
Na ₂ SiO ₃	5,0	нет
витамин B ₁₂	нет	0,001
витамин B ₁	нет	0,001
витамин H	нет	0,02

Как видно из таблицы в модификации исключены витамины, поскольку в результате исследований установлено, что их влияние на рост и развитие культур настолько незначительное, что их наличием можно пренебречь, в связи с трудоемкостью создания рабочей питательной среды.

Пересев микроводорослей осуществляют только на свежеприготовленную среду. Поскольку пересадку проводят часто, то для упрощения процесса приготовления модифицированной среды Уолна готовят концентрированные растворы макро- и микроэлементов на основе дистиллированной воды с рН 7,2.

Срок хранения этих растворов ограничен шестью месяцами. Затем готовят свежие.

Для получения свежей среды готовые концентрированные растворы макро- и микроэлементов с рН 7,2 растворы добавляют по 1 мл на 1 л фильтрованной стерилизованной морской воды.

В качестве исходного материала для культивирования используются лабораторные альгологически чистые культуры *D. salina* и *C. muelleri* из коллекции Научно-производственного департамента марикультуры Дальрыбвтуза.

Этот этап (первый) включает осенний, зимний и весенний климатические периоды.

В начале первого этапа из маточной коллекции микроводорослей НПДМ ФГБОУ ВПО «Дальрыбвтуз» обычно отбираются по 2 л каждой культуры микроводорослей и пересеиваются на свежеприготовленную питательную среду в заранее

простерилизованные 5-литровые колбы. Далее регулярно через каждые 15-20 дней производят отбор культур в стадии активного роста (определяется при подсчете клеток) и их пересев.

5 Культивирование *D. salina* и *S. muelleri* происходит в монокультуре на приготовленной на основе природной морской воды модифицированной питательной среде Уолна следующего состава, мг/л: $ZnCl_2$ - 0.21, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ - 0.3, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ - 0.14, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0.2, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ - 1.3, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ - 0.36, H_3BO_3 - 33.6, EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8 Na_2 \cdot 2H_2O$) - 45.0, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ - 30.0, $NaNO_3$ - 100.0, Na_2SiO_3 - 5.0. Не допускается
10 смешивание между собой *D. salina* и *S. muelleri*, а также их бактериальное заражение. Если подобное произошло, следует уничтожить испорченную культуру во избежание последующего заражения. Для дополнительных гарантий от заражения всех имеющихся микроводорослей *D. salina* и *S. muelleri* на данном этапе культивирование производится в стеклянных плоскодонных термостойких колбах объемом 5 л. Колбы с *D. salina* и
15 *S. muelleri* размещаются на удалении от друг друга, в пределах одного помещения на специальных стеллажах со стеклянными полками. На все колбы равномерно попадает естественный солнечный свет, однако от прямых солнечных лучей, губительных для микроводорослей, культуры защищены шторами из плотного белого материала. В течение периода с 9 до 17 часов ежедневно осуществляется дополнительно освещение
20 микроводорослей искусственными источниками света. Для этого используются люминесцентные лампы. Культуру микроводорослей регулярно перемешивают, взбалтывая, в течение всего светового дня (каждые 4 часа). Температуру поддерживают на уровне 22°C, соленость - 31%.

Культуру *D. salina* и *S. muelleri* периодически пересеивают на свежеприготовленную модифицированную питательную среду Уолна. Пересев для *D. salina* желателно
25 проводить раз в 15-20 дней, для *S. muelleri* - раз в 10-15 дней. Прирост биомассы водорослей определяют по увеличению числа клеток, которое определяют ежедневно, просчитывая клетки в каждой колбе в 2 камерах Горяева под световым микроскопом. Образцы для подсчета клеток отбирают после тщательного перемешивания в одно и
30 то же время суток через 3-4 ч после окончания темного периода и фиксируют этиловым спиртом.

Также непосредственно перед пересевом определяют количество и качество водорослей при помощи микроскопа. При пересеве в стерилизованную колбу помещают свежеприготовленную питательную среду в объеме 3 л культуру *D. salina* или *S. muelleri*
35 в требуемом объеме (в зависимости от концентрации клеток в исходной культуре) (обычно 1 л). После посева колбы закрываются стерилизованной фильтровальной бумагой.

В течение зимнего периода этапа для *S. muelleri* посев требуется выполнять каждые 20-25 дней, поскольку темп роста этих микроводорослей замедляется.

40 К концу первого этапа в результате работы по отбору культур и наращивания их объема получается запланированное ранее количество *D. salina* и *S. muelleri*, необходимое для получения достаточного количества корма в зависимости от мощности завода по культивированию дальневосточного трепанга.

Культивирование на ВТОРОМ ЭТАПЕ.

45 На данном этапе микроводоросли используют непосредственно для кормления личинок дальневосточного трепанга: их необходимо обеспечить кормом ежедневно в объеме 3 л каждого вида водорослей на 1000 л морской воды, содержащей личинки трепанга с плотностью посадки 1 экз./мл. Для культивирования микроводорослей на

втором этапе используют приготовленную на основе природной морской воды соленостью 31% среду Гольдберга следующего состава, мг/л: NaNO_3 - 50.0, KH_2PO_4 - 5.0, $(\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{NH}_4\text{OH})$ - 0.5, CON_2H_4 - 9.0 [1], поскольку модифицированную среда Уолна не подходит для кормления личинок, поскольку она вызывает гибель личинок (на 3 день кормления 70% погибли, 10% - с уродствами). На данной среде микроводоросли выращиваются в течение 4-6 дней. Далее выращивать микроводоросли не следует, поскольку они переходят в фазу замедленного роста и становятся непригодны как для кормления трепанга, так и для дальнейшего культивирования. Также возникает возможность массового развития простейшими, в том числе бактериями, по причине замедленного роста и частичной гибели культуры.

Для упрощения процесса готовят концентрированный раствор макроэлементов на основе дистиллированной воды. Для среды Гольдберга он имеет следующий состав:

Компонент	Количество г на 1 л
NaNO_3	50,0
KH_2PO_4	5,0
$(\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{NH}_4\text{OH})$	0,5
CON_2H_4	9,0

рН среды доводят до 7,2 и разливают по 1000 мл в колбы емкостью 2000 мл. Среду стерилизуют 20 мин при температуре 80°C.

Полученный раствор хранится в течение 5 дней. Затем следует приготовить новый. Для получения среды Гольдберга добавляют по 1 мл раствора элементов на 1 л фильтрованной стерилизованной морской воды соленостью 31%.

Культивирование *D. salina* и *C.muelleri* также происходит в монокультуре. Емкости с *D. salina* и *C.muelleri* размещаются в разных помещениях на специальных стеллажах. На все емкости равномерно попадает естественный солнечный свет, однако от прямых солнечных лучей, губительных для микроводорослей, культуры защищены тканью из белого хлопчатобумажного полотна.

Световой день для культур установлен в 18 часов при помощи искусственных источников света (люминесцентных ламп).

Культуру микроводорослей также регулярно перемешивают, взбалтывая, в течение всего светового дня (каждые 3 часа).

Температуру поддерживают на уровне 22°C, соленость - 31%.

Культуру *D. salina* и *C.muelleri* пересеивают со среды Уолна на свежую приготовленную на основе природной морской воды соленостью 31% питательную среду Гольдберга каждые 4 дня. На 5-7 день выращивания микроводоросли идут на корм личинок трепанга, при более длительном культивировании они утилизируются, поскольку непригодны для использования в виде корма.

Перед пересевом определяют количество и качество водорослей при помощи микроскопа. После пересева емкости закрываются стерилизованной фильтровальной бумагой. Через 4-6 дней микроводоросли из бутылей идут на корм личинок трепанга, а в колбах вновь подвергаются пересеву на свежие питательные среды в колбы и бутылки. Данный процесс завершается после оседания личинок.

Пример 1. (подготовка живого корма для личинок трепанга из культивированной микроводоросли *Dunaliella salina*).

На первом, иначе подготовительном, этапе в сентябре (осенний период) для культивирования *D. salina* отобрали природную морскую воду с соленостью 31%, затем очистили ее и простерилизовали. Затем на основе этой воды приготовили

модифицированную питательную среду Уолна следующего состава (мг/л): $ZnCl_2$ - 0.21, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ - 0.3, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ - 0.14, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0.2, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ - 1.3, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ - 0.36, H_3BO_3 - 33.6, EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$) - 45.0, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ - 30.0, $NaNO_3$ - 100.0, Na_2SiO_3 - 5.0, со значением pH, равным 7,2. После питательную среду разлили в 5-литровые заранее стерилизованные термостойкие колбы по 3 л в каждую. На следующее утро в эту питательную среду ввели инокулят *D. salina* из маточной коллекции микроводорослей НПДМ ФГБОУ ВПО «Дальрыбвтуз» в количестве по 1 л до достижения концентрации клеток 200-250 тыс кл./мл (погрешность в 50 тыс кл./мл допускается). После колбы тщательно перемешали, горлышко колбы накрыли стерилизованной фильтровальной бумагой и поставили на стеклянную полку стеллажа в помещении с культурой *D. salina*. Культура *D. salina* выращивалась при фотопериодичности 18 часов света с освещенностью 30000 люкс и 6 часов темноты, при периодическом перемешивании (каждые 3 часа в течение световой фазы фотопериода). По истечении 15 суток численность клеток *D. salina* в суспензии составила 2-2,5 млн кл./мл. Далее пересадку *D. salina* проводят каждые 15-20 дней в зависимости скорости роста культуры. Пересадка производится по достижении плотности культуры 2-2,5 млн кл./мл. В случае пересадки культуры при меньшей концентрации рост культуры замедляется, при этом в питательной среде освобождается ниша для развития других организмов - возможно заражение культуры. При более высокой плотности культура постепенно переходит на стадию отмирания - часть клеток погибает, возникают процессы гниения. В обоих случаях культура непригодна для дальнейшего выращивания.

За неделю до нереста (начало июня) трепанга начинается второй, иначе кормовой, этап культивирования *D. salina*. Выращенные на этом этапе микроводоросли являются непосредственным живым кормом для личинок трепанга.

Подготавливаются емкости для выращивания кормовых микроводорослей - 20-литровые прозрачные полипропиленовые бутылки. Подготовка морской воды производится аналогично первому этапу. На основе обработанной воды готовят питательную среду Гольдберга следующего состава, мг/л: $NaNO_3$ - 50.0, KH_2PO_4 - 5.0, $(FeC_6H_5O_7 \cdot NH_4OH)$ - 0.5, CON_2H_4 - 9.0.

Питательную среду разливают в бутылки по 12 л в каждый. На следующее утро в эту питательную среду вводят суспензию *D. salina*, ранее выращенную на первом этапе до плотности 2-2,5 млн кл./мл, в количестве по 4 л на бутылку до достижения концентрации клеток 200-250 тыс. кл./мл. После бутылки тщательно перемешивают, горлышко колбы накрывают стерилизованной фильтровальной бумагой и помещают на деревянную полку стеллажа в помещении с кормовой культурой *D. salina*. Культуру *D. salina* выращивают при фотопериодичности 18 часов света с освещенностью 30000 люкс и 6 часов темноты, при периодическом перемешивании (каждые 3 часа в течение световой фазы фотопериода). По истечении 4-6 суток (в зависимости от скорости роста) численность клеток в суспензии составляет 1-1,5 млн кл./мл. Полученная культура *D. salina* пригодна для кормления личинок трепанга и на 6-7 сутки должна быть полностью использована для кормления личинок дальневосточного трепанга.

Пример 2. (подготовка живого корма для личинок трепанга из культивированной микроводоросли *Chaetoceros muelleri*)

На первом этапе в сентябре (осенний период) *C.muelleri* культивируют аналогично *D. salina* на первом этапе, за исключением пересадки - она производится каждые 10-15 дней, а в зимний период (с декабря по февраль) - каждые 20-25 дней (в зависимости скорости роста культуры).

На втором этапе (июнь-июль/начало августа) *S.muelleri* культивируют аналогично *D. salina* на втором этапе.

Список цитированных литературных источников

1. Чжан Я Цин, Дин Цзюнь, Сун Цзянь, Ян Вэй Дэн. Трепанг и морской еж. Биология, исследование и разведение. - Далянь: Даляньский Рыбохозяйственный университет, 2001. - 202 с.
2. Паньков С.Л., Панькова С.Л., Герадзе К.Н. Опыт массового культивирования микроводорослей в условиях марихозяйства // Живые корма для объектов марикультуры. - М., 1988. - С. 26-33.
3. Хребтова Е.В. Влияние микроводорослей на рост и развитие личинок черноморской устрицы // Живые корма для объектов марикультуры. - М., 1988. - С. 15-26.
4. Методика получения и выращивания молоди дальневосточного трепанга в искусственных условиях. - Владивосток: Дальрыбвтуз, 2011. - 13 с.
5. Walne, P.R. 1970. Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria*. and *Mvtilus*. Fishery Investigations, London Series 2 26(5):1-62.
6. Авсиян А.Л., Лелеков А.С. Влияние светового режима на продуктивность культуры *Spirulina platensis* / Pontus Euxinus 2011: Тез. VII междунар. науч.-практ. конф. по проблемам водных экосистем, посвящ. 140-летию ИнБЮМ НАНУ. - Севастополь, 2011. - С. 16-17.

Формула изобретения

Способ подготовки кормов из микроводорослей для личинок дальневосточного трепанга, включающий культивирование альгологически чистых монокультур микроводорослей на питательной среде, приготовленной на основе природной соленой воды, отличающийся тем, что в качестве микроводорослей используют одноклеточные водоросли *Dunaliella salina* и *Chaetoceros muelleri*, которые культивируют круглый год в два этапа: на первом подготовительном этапе наращивают биомассу водорослей и проводят отбор наиболее жизнеспособных монокультур, которые инокулируют раздельно в светопроницаемые культуральные емкости на приготовленную на основе природной морской воды соленостью 31% модифицированную питательную среду Уолна, мг/л следующего состава:

	ZnCl ₂	0,21
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,3
35	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,14
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,2
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	1,3
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,36
	H ₃ BO ₃	33,6
40	EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ ·2H ₂ O)	45,0
	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	30,0
	NaNO ₃	100,0
	Na ₂ SiO ₃	5,0

и культивируют при температуре 22°C, рН среды 7,2 при фотопериодичности 18 часов света с освещенностью 30000 люкс и 6 часов темноты, в светопроницаемых емкостях при периодическом перемешивании до плотности 2-2,5 млн кл./мл с последующими пересадками на свежую среду этого же состава, при этом пересадку *Dunaliella salina* проводят каждые 15-20 дней в течение всего подготовительного этапа,

а *Chaetoceros muelleri* - каждые 10-15 дней, и только в зимний период этого этапа пересадку проводят каждые 20-25 дней; на втором, кормовом этапе, за 7 дней до нереста трепанга и в течение всего кормового периода личинок трепанга каждые 4 дня полученные биомассы монокультур порционно кондиционируют путем выращивания на приготовленной на основе природной морской воды соленостью 31% питательной среде Гольдберга при температуре 22°C, рН среды 7,2 и фотопериодичности 18 часов света с освещенностью 30000 люкс и 6 часов темноты, в светопроницаемых культуральных емкостях при периодическом перемешивании в течение 4-6 суток до плотности 1,0-1,5 млн кл./мл.

10

15

20

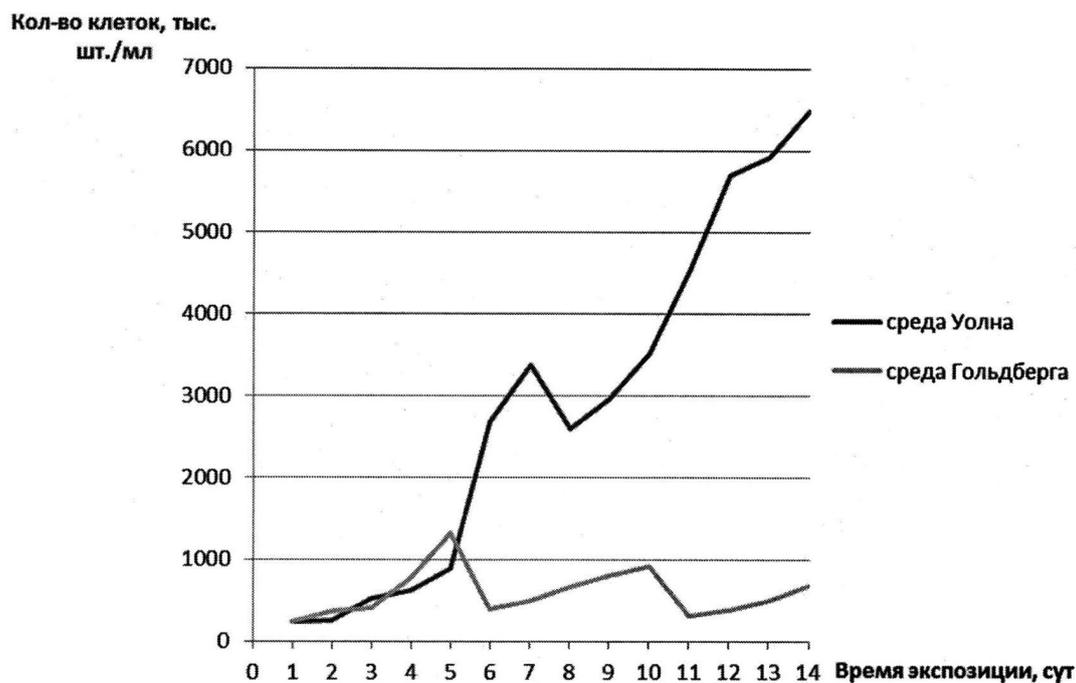
25

30

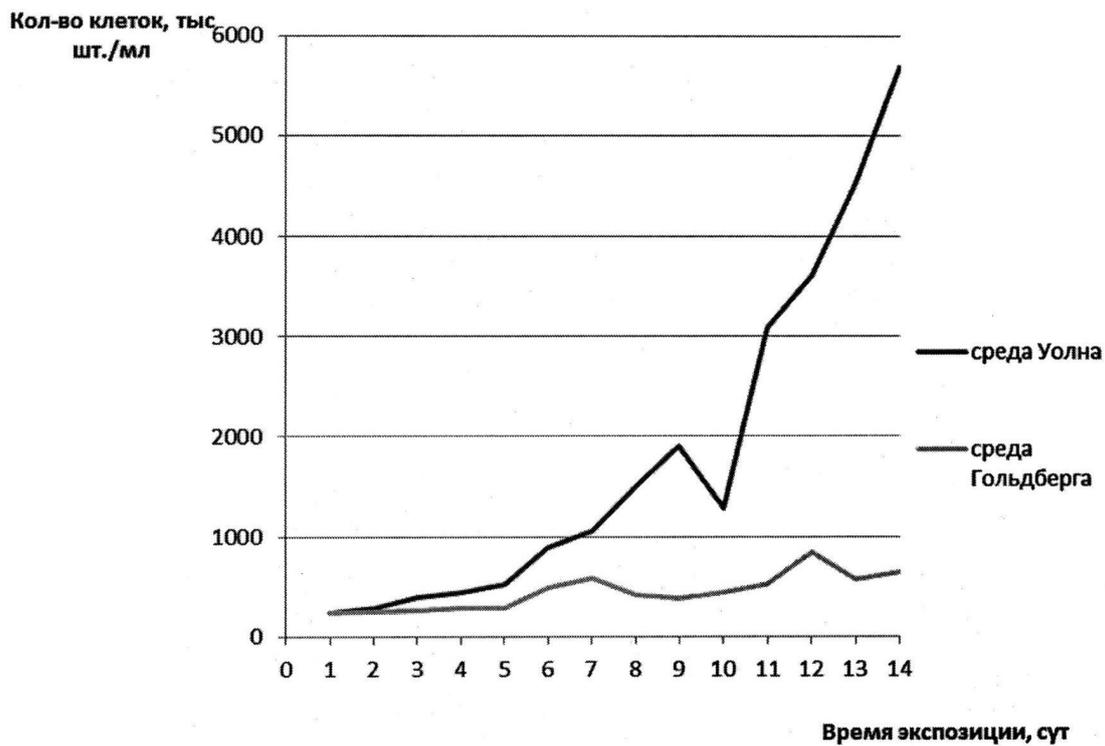
35

40

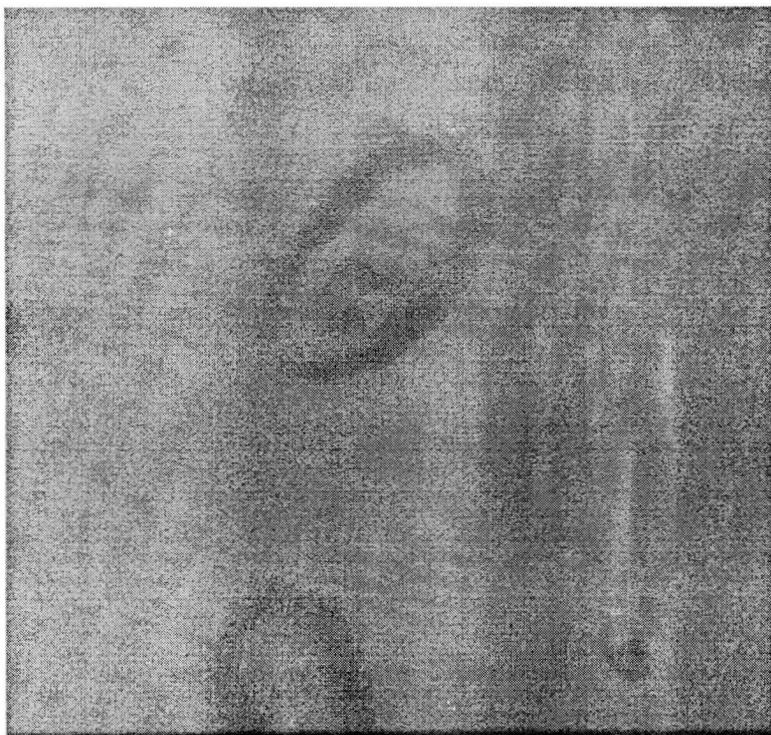
45



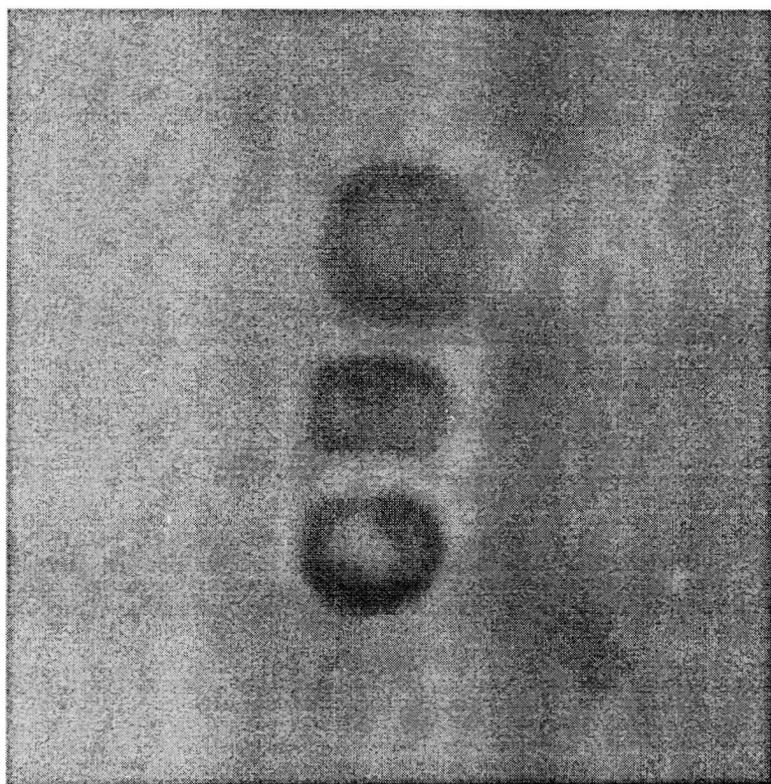
Фиг. 1



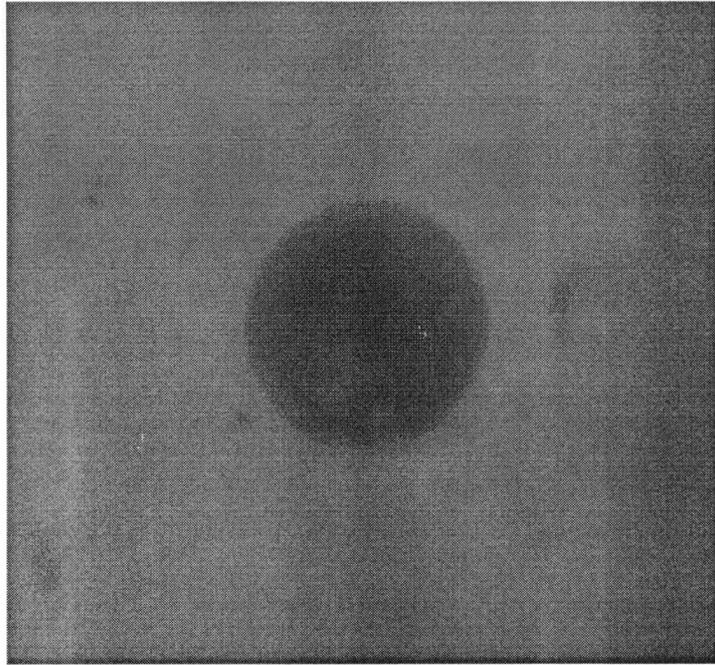
Фиг. 2



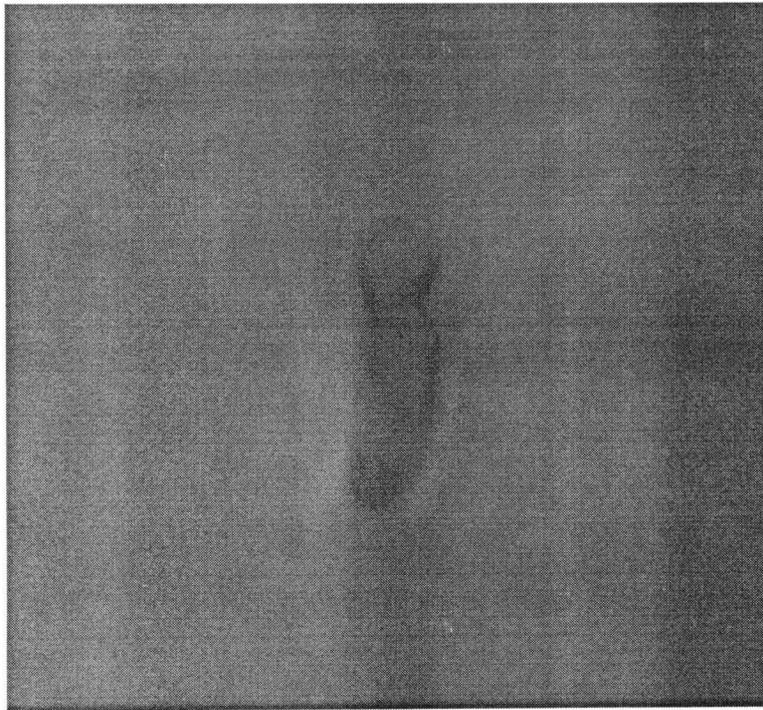
Фиг. 3



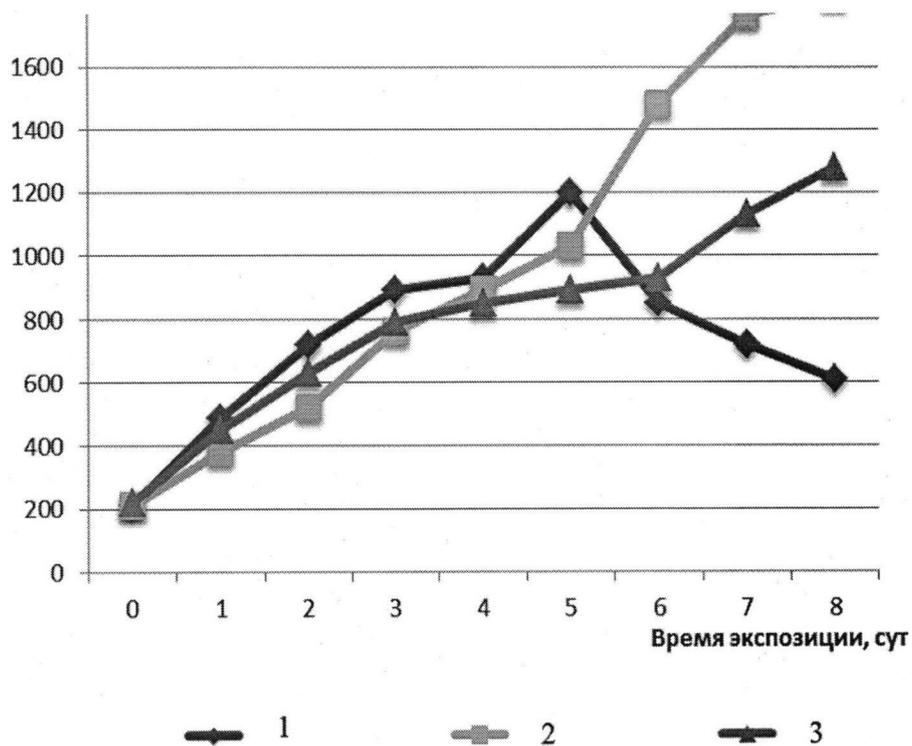
Фиг. 4



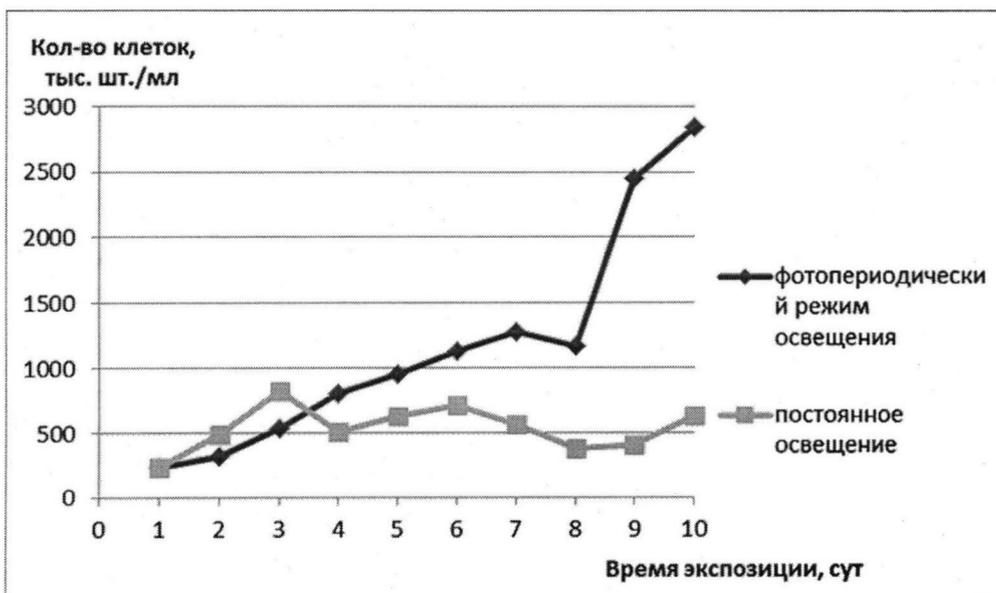
Фиг. 5



Фиг.6



Фиг. 7



Фиг. 8