



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A01K 61/00 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2017121508, 19.06.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
19.06.2017

Дата регистрации:
03.08.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 19.06.2017

(45) Опубликовано: 03.08.2018 Бюл. № 22

Адрес для переписки:
299011, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2,
Директору Федерального государственного
бюджетного учреждения науки "Институт
морских биологических исследований имени
А.О.Ковалевского РАН" д.б.н. проф. С.Б.Гулину

(72) Автор(ы):

Ладыгина Людмила Владимировна (RU),
Пиркова Анна Васильевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки "Институт морских
биологических исследований имени А.О.
Ковалевского РАН" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2566672 C1, 27.10.2015. RU
2284105 C2, 27.09.2006. RU 2541458 C1,
10.02.2015.

(54) СПОСОБ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДИАТОМОВОЙ ВОДОРΟΣЛИ SNAETOCEROS CALCITRANS
- КОРМА ДЛЯ ЛИЧИНОК ГИГАНТСКОЙ УСТРИЦЫ CRASSOSTREA GIGAS

(57) Реферат:

Способ предусматривает культивирование водоросли в течение 11 суток при температура 22-24°C, освещенности 10 клк, аэрации смесью воздуха и углекислого газа (2%), на модифицированной питательной среде на основе стерильной морской воды. Содержание

биогенных элементов пропорционально увеличивают до следующих значений, г/л: NaNO₃ 600, NaH₂PO₄·2H₂O 40, FeCl₃·6H₂O 28, Na₂ЭДТА 34,88, Na₂SiO₃·9H₂O 240, MnCl₂·4H₂O 1,8. Способ обеспечивает максимальное накопление биомассы водоросли. 3 табл., 2 ил.

RU 2 663 328 C1

RU 2 663 328 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
A01K 61/00 (2006.01)

(21)(22) Application: **2017121508, 19.06.2017**

(24) Effective date for property rights:
19.06.2017

Registration date:
03.08.2018

Priority:

(22) Date of filing: **19.06.2017**

(45) Date of publication: **03.08.2018** Bull. № 22

Mail address:

**299011, g. Sevastopol, pr. Nakhimova, 2, Direktoru
Federalnogo gosudarstvennogo byudzhethnogo
uchrezhdeniya nauki "Institut morskikh
biologicheskikh issledovanij imeni
A.O.Kovalevskogo RAN" d.b.n. prof. S.B.Gulinu**

(72) Inventor(s):

**Ladygina Lyudmila Vladimirovna (RU),
Pirkova Anna Vasilevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe
uchrezhdenie nauki "Institut morskikh
biologicheskikh issledovanij imeni A.O.
Kovalevskogo RAN" (RU)**

(54) **METHOD OF CULTIVATION OF DIATOMIC ALKALINE CHAETOCEROS CALCITRANS - FOOD FOR LARVAE OF GIANT OYSTERS CRASSOSTREA GIGAS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: method provides for cultivation of algae for 11 days at a temperature of 22–24 °C, illuminance 10 kl, aeration with a mixture of air and carbon dioxide (2 %), on a modified nutrient medium based on sterile sea water. Content of biogenic elements is proportionally increased to the following values, g/l:

**NaNO₃ 600, NaH₂PO₄·2H₂O 40, FeCl₃·6H₂O 28,
Na₂EDTA 34.88, Na₂SiO₃·9H₂O 240, MnCl₂·4H₂O
1.8.**

EFFECT: method ensures maximum accumulation of algae biomass.

1 cl, 3 tbl, 2 dwg

Изобретение относится к марикультуре, точнее к биотехнологии микроводорослей, и может быть использовано при полупромышленном получении биомассы диатомовой водоросли *Chaetoceros calcitrans*.

Микроводоросли являются единственным полноценным кормом для личинок и спата двустворчатых моллюсков, выращиваемых в питомнике. Полупромышленное культивирование одноклеточных водорослей предусматривает получение их максимальных биомасс, используемых в качестве корма личинкам на разных стадиях развития и спата при подращивании в питомнике.

Диатомовая водоросль *Chaetoceros calcitrans* является хорошим кормовым объектом благодаря своим морфологическим и биохимическим характеристикам и поэтому широко используется в питомниках при выращивании двустворчатых моллюсков. Клетки водоросли цилиндрические, одиночные с хорошо развитыми щетинками, имеют тонкий панцирь; средняя длина клеток $9,2 \pm 0,43$ мкм, ширина - $4,2 \pm 0,15$ мкм, объем - $52,0 \pm 12,04$ мкм³. Они легко заглатываются личинками двустворчатых моллюсков (мидий и устриц) и быстро перевариваются. Питательная ценность микроводоросли связана с высоким содержанием белка - 40,35%; липидов - 27,0%; углеводов - 21,32%.

Известен способ культивирования *C. calcitrans* [Kaspar Heinrich F., et. al. 2014], где в качестве культиваторов используют стеклянные бутылки ($V=2-2,5$ л), полиэтиленовые мешки ($V=17$ л) и резервуары больших объемов ($V=100-500$ л). Микроводоросль выращивают на питательной среде F/2, содержащей, г/л: NaNO_3 - 75; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 5; $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ - 30; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 3,5; $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ - 4,36; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 1,8. При культивировании водоросли *C. calcitrans* в мешках ($V=17$ л) в полунепрерывном режиме на питательной среде F/2 при освещенности 2-5 клк максимальные концентрации клеток достигали $7,13 \times 10^6$ кл/мл.

В питомнике IFREMER (Франция) [Helm et. al., 2004] при выращивании *C. calcitrans* в культиваторах $V=2$ л на среде F/2, концентрация клеток составляла 60×10^3 кл/мл.

Общим недостатком приведенных способов является получение низких значений численности клеток и биомассы *C. calcitrans*, что существенно повлияет на темп роста личинок двустворчатых моллюсков. Личинкам необходимо будет профильтровать значительно больший объем морской воды, чтобы удовлетворить свои пищевые потребности. В результате энергетические затраты личинок увеличиваются, а темп роста и выживаемость снижаются. Вследствие этого продолжительность выращивания личинок увеличивается, что приведет к нерентабельности работы питомника (затраты человеческих ресурсов, электроэнергии, воды и т.д).

Известен способ подготовки кормов из микроводорослей для личинок дальневосточного трепанга (Патент RU 2 566672 C1), где в качестве корма используют микроводоросли *Dunaliella salina* и *Chaetoceros muelleri*. Способ заключается в одновременном культивировании микроводорослей на модифицированной питательной среде Уолна и Гольдберга при освещенности 30 клк, фотопериоде 18:6, температуре 22°C и периодическом перемешивании. Максимальная концентрации клеток диатомовой водоросли *C. muelleri* составляла $5,68 \times 10^6$ кл/мл.

Недостатком данного способа является культивирование микроводорослей на питательных средах обедненных биогенными элементами и при высокой интенсивности света. При таких условиях культивирования адаптационный период культур значительно увеличивается, что экономически не целесообразно. Освещенность 30 клк способствует ингибированию ростовых процессов и частичной гибели клеток, что провоцирует

развитие бактериоплактона в культуре, а такой корм, внесенный в выростные емкости, может привести к гибели личинок.

Наиболее близким к заявляемому по достигаемому техническому результату является способ [Krichnavaruk, et. al., 2005] выращивания микроводоросли в накопительном режиме в полиэтиленовых мешках ($V=17$ л) и колбах ($V=2$ л) на модифицированный питательной среде F/2 с двукратным увеличением концентраций диоксида кремния и фосфора, при интенсивности света $400 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ сек}^{-1}$ (≈ 56 клк). При таких условиях культивирования получены максимальные концентрации клеток $5,8 \times 10^6$ кл/мл в колбах и $8,88 \times 10^6$ кл./мл - в мешках.

Недостатками известного способа культивирования является получение низких значений численности клеток *C. calcitrans* при высокой интенсивности света (≈ 56 клк), что является экономически нерентабельно для питомников по выращиванию личинок гигантской устрицы.

Задачей изобретения Способ культивирования диатомовой водоросли *Chaetoceros calcitrans* - корма для личинок гигантской устрицы *Crassostrea gigas* является увеличение выхода биомассы водоросли путем модификации питательной среды и оптимизации условий культивирования.

Техническим результатом изобретения является получение полноценного корма и в достаточном количестве для личинок и спата моллюсков, выращиваемых в питомнике.

Поставленная задача и заявленный технический результат достигаются тем, что в способе культивирования диатомовой водоросли *Chaetoceros calcitrans* - корма для личинок гигантской устрицы *Crassostrea gigas*, включающем культивирование микроводоросли в накопительном режиме на питательной среде F/2, предусмотрены следующие отличия. Водоросль культивируют в течение 11 сут. при температуре $22-24^\circ\text{C}$, освещенности 10 клк, аэрации смесью воздуха и углекислого газа (2%). Кроме того, питательная среда F/2, приготовленная на стерильной морской воде соленостью 18‰, модифицируется, для чего содержание биогенных элементов пропорционально увеличивается до следующих значений, г/л: NaNO_3 - 600, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 40, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 28, $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ - 34,88, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ - 240, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 1,8.

Изобретения поясняется иллюстрациями:

на Фиг. 1 - Динамика накопления биомассы микроводоросли *Chaetoceros calcitrans* на модифицированных питательных средах: 1 - среда 4F; 2 - среда Конвея;

на Фиг. 2 - Динамика роста личинок устрицы *Crassostrea gigas* при использовании в качестве корма микроводоросли *Chaetoceros calcitrans*, культивируемой на среде 4F (1) и среде Конвея (2).

В питомнике ИМБИ РАН в экспериментах для определения оптимальных условий культивирования микроводоросли *C. calcitrans* использовались модифицированные питательные среды Конвея и Guillard F/2. Питательная среда F/2 является обедненной по многим биогенным элементам, поэтому их содержание было пропорционально увеличено до получения среды 4F. В среде Конвея увеличили концентрацию железа, т.к. его потребности в стандартной среде занижены и не достаточны для биосинтеза, что подтверждается низкими значениями биомассы водорослей (табл. 1).

Таблица 1. Состав маточных растворов модифицированных питательных сред Конвея и F/2

Состав питательной среды	Концентрация биогенов в модифицированных питательных средах, г/л	
	Конвея	4F
NaNO ₃	100	600
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	20	40

FeCl ₃ · 6 H ₂ O	5,2	28
Na ₂ ЭДТА	45	34,88
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	–	240
H ₃ BO ₃	33,6	–
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0,36	1,8

Маточные растворы питательных сред готовили на дистиллированной воде. Рабочий раствор (т.е. питательная среда, на которой впоследствии культивировали водоросли) готовили на стерильной морской воде соленостью 18‰, из расчета: на 1 л морской воды добавляли 1 мл маточного раствора питательной среды

Микроводоросль культивировали в накопительном режиме в колбах (V=2 л) при температуре 24°C, круглосуточном освещении 6 клк и постоянном барботаже воздухом. Максимальная концентрация клеток 18,41×10⁶ кл/мл получена на среде 4F, что почти в 18 раз больше, чем на модифицированной среде Конвея (табл. 2) и значительно больше, чем в других известных способах. Среднесуточный прирост клеток водоросли на среде 4 F и Конвея составлял 1,72 млн. кл.мл⁻¹сут⁻¹ и 0,03 млн. кл.мл⁻¹сут⁻¹ соответственно.

Таблица 2. Максимальная концентрация клеток и биомасса *S. calcitrans* при выращивании в колбах в накопительном режиме на модифицированных питательных средах.

Питательная среда модифицированная	Концентрация, 10 ⁶ кл/мл	Максимальная биомасса, г/л
Конвея	1,03	0,328
4F	18,41	8,089

Для увеличения выхода биомассы микроводоросли *S. calcitrans* в питомнике ИМБИ РАН в качестве культиваторов использовали одноразовые полиэтиленовые мешки (V=20 л). Водоросль наращивали в накопительном режиме при температуре 22-24°C, освещенности 10 клк. и аэрации смесью воздуха и углекислого газа (2%) на питательной среде 4F и на среде Конвея. Динамика накопления биомассы микроводоросли *S. calcitrans* на модифицированных питательных средах показана на Фиг. 1. При таком режиме культивирования максимальная численность клеток и биомасса на питательной среде 4F также были значительно больше, чем на среде Конвея, и составляли соответственно

11,22×10⁶ кл/мл и 4,93 г/л (табл. 3). Максимальная продуктивность водоросли на модифицированной среде 4F наблюдалась на 5-6 сутки культивирования и составляла 3,9 г·л⁻¹·сут⁻¹.

5

Таблица 3. Максимальная концентрация клеток и биомасса *C. calcitrans* при выращивании в полиэтиленовых мешках в накопительном режиме на модифицированных питательных средах.

10

Питательная среда	Концентрация, 10 ⁶ кл/мл	Максимальная сырая биомасса, г/л
Конвея	0,64	0,204
4F	11,22	4,93

15

Зависимость биомассы микроводоросли от содержания биогенов в среде 4F и Конвея определялась линейной функцией, при этом коэффициент детерминации R² составлял: 0,92 и 0,88 соответственно (Фиг. 1).

20

Накопительный режим культивирования позволил получить биомассу водоросли с максимальным содержанием липидов, необходимых личинкам на поздних стадиях развития и успешному прохождению метаморфоза.

Пример реализации способа

25

В питомнике ИМБИ РАН диатомовую водоросль *C. calcitrans* культивировали в полиэтиленовых мешках (V=20 л) в накопительном режиме на питательной среде 4F, приготовленной на стерильной морской воде соленостью 18‰, при следующих значениях компонентов среды, г/л: NaNO₃ - 600; NaH₂PO₄·2H₂O - 40; FeCl₃·6H₂O - 28; Na₂ЭДТА - 34,88; Na₂SiO₃·9H₂O - 240; MnCl₂·4H₂O - 1,8.

30

Водоросль культивировали при оптимальных условиях: температура 22-24°C, освещенность 10 клк, аэрация смесью воздуха и углекислого газа (2%). Максимальная численность клеток и биомасса получены на 11 сутки и составляли соответственно 11,22×10⁶ кл/мл и 4,93 г/л. Культура находилась на стационарной фазе роста и содержала максимальное количество липидов - 27,0%. Таким образом, продолжительность культивирования водоросли *C. calcitrans* в накопительном режиме составляла 11 суток.

35

При выращивании личинок и спата гигантской устрицы в питомнике микроводоросль *C. calcitrans* является основным кормом и входит в состав рациона на всех стадиях развития. Среднесуточный темп роста личинок гигантской устрицы, в рацион которых входила водоросль, культивируемая на среде 4F, был значительно выше (43,6 мкм сут⁻¹), чем на среде Конвея (25,2 мкм сут⁻¹). При этом личинки достигали максимальных размеров 385 мкм уже на 19 сутки выращивания. Когда личинок устриц кормили водорослью *C. calcitrans*, культивируемой на среде Конвея, максимального размера 392 мкм они достигали только на 23 сутки выращивания (Фиг. 2).

40

Таким образом, питательная среда 4F и предложенные условия выращивания при температуре 22-24°C и освещенности 10 клк. являются оптимальными при культивировании микроводоросли *C. calcitrans* в питомнике ИМБИ и способствуют максимальному накоплению биомассы водоросли. Использование водоросли в качестве корма для личинок гигантской устрицы способствовало их высокому темпу роста.

Источники информации

1. Ким Г.Н., Журба Е.К., Калинина Г.Г., Советкина А.С., Азьмука Т.М. Способ подготовки кормов из микроводорослей для личинок дальневосточного трепанга (Патент RU 2566672 C1, опубл.: 27.10.2015, бюл. №30)

5 2. Kaspar Heinrich F., Keys Elizabeth F., King Nick, Smith Kirsty F., Kesarcodi-Watson Aditya, Miller Matthew R. Continuous production of *Chaetoceros calcitrans* in a system suitable for commercial hatcheries // *Aquaculture*. - 2014. - V. - 420-421. - P. 1-9.

3. Krichnavaruk Sontaya, Loataweesup Worapannee, Powtongsook Sorawit, Pavasant Plasert. Optimal growth conditions and the cultivation of *Chaetoceros calcitrans* in airlift photobioreactor // *Chemical Engineering Journal*. - 2005. - V. 105, №3. - P. 91-98.

10 4. Helm Michael M., Bourne Neil. Hatchery culture of bivalves // *A practical manual*. FAO FISHERIES TECHNICAL PAPER, 2004. - 471 p.

(57) Формула изобретения

15 Способ культивирования диатомовой водоросли *Chaetoceros calcitrans* - корма для личинок гигантской устрицы *Crassostrea gigas*, включающий культивирование микроводоросли в накопительном режиме на питательной среде F/2, отличающийся тем, что водоросль культивируют в течение 11 сут. при температура 22-24°C, освещенности 10 клк, аэрации смесью воздуха и углекислого газа (2%), на модифицированной питательной среде на основе стерильной морской воды соленостью 20 18‰, для чего содержание биогенных элементов пропорционально увеличивают до следующих значений, г/л:

	NaNO ₃	600
	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	40
25	FeCl ₃ ·6H ₂ O	28
	Na ₂ ЭДТА	34,88
	Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	240
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,8

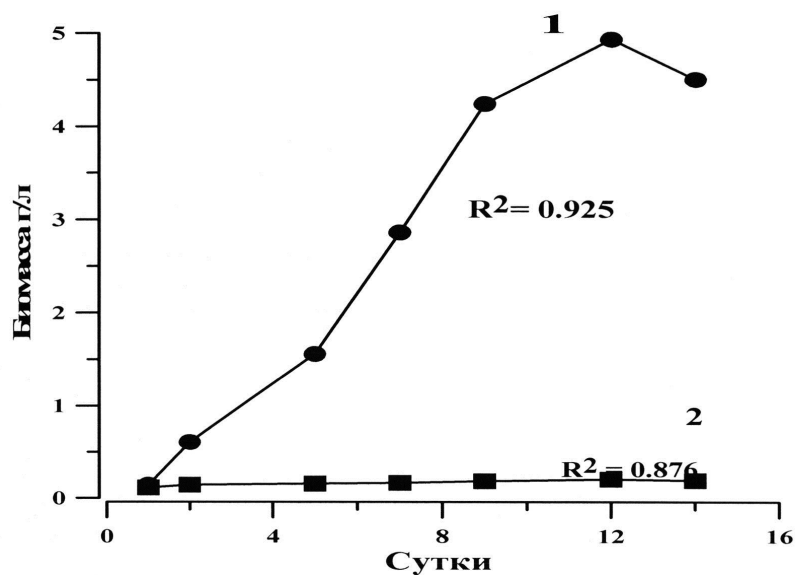
30

35

40

45

Способ культивирования диатомовой водоросли *Chaetoceros calcitrans* – корма для личинок гигантской устрицы *Crassostrea gigas*



Фиг. 1



Фиг. 2