# ВЫРАЩИВАНИЕ КОЛОВРАТОК BRACHIONUS PLICATILIS НА МИКРОВОДОРОСЛЯХ РАЗНЫХ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ГРУПП

### Кваша А.В.

г. Севастополь, ГБОУ «Общеобразовательная школа №36 начального и основного общего образования», 9 класс

Руководитель: Найданова О.Г., Зав. музейным отделом ОП Севастопольский морской Аквариуммузей, руководитель творческого объединения «Юные экологи», ГБОУ ДО «Севастопольский центр эколого-натуралистического творчества учащейся молодежи»

Проблема кормов относится к числу важнейших проблем морской аквакультуры. При выращивании водных животных в искусственных условиях используемые корма должны полностью удовлетворять потребности организма рыб или беспозвоночных веществах питательных (белках, жирах углеводах), минеральных солях, микроэлементах и витаминах. На разных этапах развития гидробионтов пища должна быть соответствующего размера и формы [3].

Особенно остро в аквариумистике стоит вопрос о кормлении мальков рыб и мелких беспозвоночных животных. Например, кораллы, у которых нет симбиотических водорослей зооксантелл, должны получать корм извне, а поскольку в аквариумах обычно развивается небольшое количество зоопланктона, то в отсутствие дополнительного корма они находятся в угнетенном состоянии (рис.1, А и Б). Для поддержания нормального, здорового состояния коралла, его нужно кормить искусственно минимум раз в неделю [1, 2].

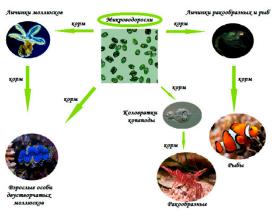




Рис. 1. А) Голодная и очень слабая тубастрея в отсаднике на откорме.
Б) Сильная сытая тубастрея на постоянном месте в аквариуме.

Еще одна проблема – это выращивание мальков, в частности их выкармливание. этапом жизни Важным В многих водных животных становится переход к самостоятельному питанию. Оказывается, что рыбы и ракообразные особенно требовательны к кормам именно на ранних этапах онтогенеза. Установлено, что для нормального развития и оптимального роста личинок и молоди культивируемых гидробионтов предпочтительны живые корма. В морской аквакультуре используются те кормовые организмы, которые можно выращивать в необходимом количестве в искусственных условиях [3].

Солоноватоводные коловратки — традиционный начальный живой корм для личинок морских рыб и беспозвоночных в условиях искусственного выращивания. По размерно-морфологическим характеристикам они подходят большинству личинок морских организмов в качестве стартового живого кормового организма при переходе на внешнее питание (Рис. 2) [11, 13, 15].



Puc. 2. Использование микроводорослей в аквакультуре

С точки зрения затрат эффективное культивирование коловраток опирается на дешевые питательные источники, поэтому пекарские дрожжи были и остаются основным компонентом питательных эмульсий для их кормления. Однако хорошо известно, что на дрожжевом рационе

коловратки испытывают незаменимых жирных кислот, необходимых для высоких показателей роста рыб и беспозвоночных [6]. Но многие исследователи считают, что культивирование коловраток как корма для морских гидробионтов необходимо проводить на одноклеточных микроводорослях. Одноклеточные водоросли удовлетворяют требованиям массового культивирования коловраток по множественным параметрам. В отличие от дрожжей они: 1) более питательны, и коловратки, питающиеся ими, соответствуют по биохимическому составу потребностям личинкам морских рыб для нормального роста и развития (табл. 1); 2) находятся в толще воды в подвижном состоянии, а не оседают на дно, как дрожжи; 3) в связи с этим, в отличие от последних, не создают благоприятные условия для развития простейших, весьма нежелательных при массовом культивировании коловраток, ибо их токсины отрицательно воздействуют на рост культуры, а сами они являются пищевыми конкурентами коловраток и создают дефицит кислорода; 4) улучшают гидрохимический фон среды, включая в свой метаболизм отходы жизнедеятельности организмов в форме как неорганических, так и органических соединений [15].

Таблица 1 Максимальное содержание (% от сухого веса) белка, углеводов, липидов в кормовых микроводорослях и их суммарная калорийность (ккал/г СВ)

Вид водорослей	Белок	Угле- воды	Ли- пиды	Сум- мар- ная кало- рий- ность
Phaeodactylum tricornutum [15]	40,7	20,8	20,0	4,77
Tetraselmis suecica [15]	40,35	21,32	27,0	4,17
Isochrysis galbana [15]	49,8	28,4	25,6	6,24
Chlorella sp. [7]	40–55	35	5-10	4,15

В Севастопольском морском Аквариуме-музее огромное количество гидробионтов, содержащихся в искусственных экосистемах. Это не только рыбы, но и многие представители беспозвоночных. В связи с необходимостью обеспечения их качественным живым кормом, возникла необходимость освоения методов культивирования морского зоопланктона, в частности, солоноватоводной коловратки Brachionus plicatilis. Поэтому, целью данной научноисследовательской работы было получение количественных характеристик процесса выращивания коловраток Brachionus plicatilis на микроводорослях разных таксономических групп, рекомендуемых для этих целей: Isochrysis galbana, Chlorella sp., Phaeodactylum tricornutum и Tetraselmis suecica [4, 12, 13]. Для достижения поставленной цели следовало решить ряд задач:

- 1. Ознакомиться с литературой по теме исследования;
- 2. Изучить теоретические основы культивирования микроводорослей и коловраток;
- 3. Подготовить посуду и необходимое оборудование;
- 4. Освоить микроскопию с использованием микроскопов БИОЛАМ и МБС с различным увеличением;
- 5. Приготовить среду Уолна для культивирования микроводорослей;
- 6. Освоить методы подсчета микроводорослей (в камере Горяева) и коловраток (в камере Богорова);
- 7. Произвести посев микроводорослей в подготовленную среду;
- 8. Вести ежедневный подсчет количества клеток водорослей в накопительной культуре;
- 9. Произвести высев культуры коловраток в емкости с накопительными культурами микроводорослей;
- 10. Вести ежедневный количественный учет клеток водорослей и коловраток;
- 11. Свести все полученные данные в таблицы, произвести необходимые расчеты, построить графики;
- 12. Рассчитать стоимость проекта по получению живых кормов;
  - 13. Сделать выводы.

## Материалы и методы

В качестве пищевых объектов в экспериментальных исследованиях коловраток были использованы следующие микроводоросли (табл. 2) [11].

Источником моновидовых накопительных культур этих микроводорослей служили линии микроводорослей, выращенные группой культивирования рыб отдела аквакультуры и морской фармакологии ИМБИ РАН, исходно полученные из музея-коллекции живых культур морских микроводорослей ИМБИ РАН (ранее ИнБЮМ).

Isochrysis galbana – золотистая микроводоросль. Клетки сферические подвижные, с двумя равными жгутиками [16].

*Tetraselmis suecica* — зеленая микроводоросль. Клетки зеленые, овальные. Клетки подвижные с 4 жгутиками длиной 7,5 мкм. Имеют мягкую оболочку. Обладают высокой скоростью размножения, до 4 делений в сутки [16].

Phaeodactylum *tricornutum* – одноклеточные диатомовые водоросли [17]. *Chlorella sp.*- микроскопическая зеленая водоросль [8].

Таблица 2 Размерные характеристики и объемы клеток микроводорослей

Вид микроводорослей	Дли- на клет- ки (мкм)	Объем клетки (мкм <sup>3</sup> )	Класс
Isochrysis galbana	3 – 5	39,19	Prymnesiophyceae
Chlorella sp.	2 – 4	14,14	Trebouxiophyceae
Phaeodactylum tricornutum	4-5	113,0	Bacillariophyceae
Tetraselmis suecica	7 – 14	505,3	Prasinophyceae



Рис. 2. Схема подготовки питательной среды и массового культивирования микроводорослей

Использованные в экспериментах микроводоросли выращивали в накопительном режиме на основе стерилизованной черноморской воды обогащенной средой Уолна [9], при температуре  $23 \pm 1.5$  °C. Круглосуточное освеще-

ние интенсивностью 900 lux осуществляли с помощью люминесцентных ламп для растений FLUORA L18W/77 (рис. 2).

Вrachionus plicatilis Muller — солоноватоводная (диапазон солености 9-32‰) планктонная коловратка со слабовыраженной пищевой избирательностью, предпочитающая клетки 1-15 µм в диаметре, питающаяся бактериями, дрожжами, одноклеточными водорослями [15].

размеры, Малые невысокая подвижность И толерантность аутоингибированию при высоких плотностях определяютих технологичность при выращивании в массовых культурах. При искусственном культивировании используют обычно партеногенетические клоны коловраток Brachionus plicatilis, которые состоят из диплоидных самок, воспроизводящих себе подобных, полностью идентичных дочерних особей с диплоидным набором хромосом. Эти клоны очень технологичны в эксплуатации, так как их продукционные показатели значительно выше циклично партеногенетических культур коловраток [11].

Культура коловраток *Brachionus plicatilis* была добавлена в культуры микроводорослей, находящихся в стадии экспоненциального роста, которые считаются более качественным кормом.

Партеногенетическая культура коловраток *Brachionus plicatilis* Mulleri – из коллекции живых культур планктона группы культивирования рыб отдела аквакультуры и морской фармакологии ИМБИ РАН.

Определение плотности (численности) клеток водорослей методом прямого подсчета в камере Горяева [10]. Содержимое колбы с водорослями перемешивали вручную, затем пипеткой отбирали суспензию водорослей (аликвоту) и наносили по одной капле на верхнюю и нижнюю части сетки счетной камеры Горяева. Затем камеру накрывали покровным стеклом, которое притирали по бокам до появления колец интерференции. Капли суспензии водорослей наносили не подряд из одной пипетки, а при двукратном взятии суспензии в пипетку из одной и той же колбы.

Через 1-2 мин после оседания клеток водорослей камеру Горяева помещали под объектив бинокулярного микроскопа БИОЛАМ ЛОМО с фазовым контрастом КФ-4 и подсчитывали количество клеток водорослей во всех 25 больших квадратах сетки.

Плотность (численность) клеток водорослей в 1 см суспензии водорослей рассчитывали по формуле:

$$X = m \cdot 10^4$$

где m – суммарное количество клеток водорослей в учтенных больших квадратах сетки;

104 – коэффициент пересчета кубических миллиметров в кубические сантиметры.

Плотность (численность) клеток водорослей подсчитывают в каждой колбе, отбирая по две аликвоты.

Биомасса водорослей. Принимая удельный вес клетки пресноводных и солоноватоводных видов равным единице, биомассу водорослей вычисляли по формуле [5]:

$$W_{\text{кл.}} = V_{\text{кл.}} \cdot \rho \text{ (мкг/мл)},$$

Численность коловраток *Brachionus* plicatilis определяли прямым подсчетом в камере Богорова [14].

Удельную скорость роста ( $\mu_{cp.}$ ) за определенный промежуток времени определяли по формуле:

$$\mu_{\text{cp.}} = \frac{\ln X_1 - \ln X_0}{t_1 - t_0} \text{ (cyt-1)},$$

где  $X_{_{I}}$  и  $X_{_{0}}$  — биомасса организмов соответственно в начале и конце роста;  $t_{_{I}}-t_{_{0}}$ — время роста [4, 5].

# Обсуждение полученных результатов

Наиболее энергосберегающий способ культивирования – накопительный – широко применяется в марикультуре из-за простоты и гибкости в обращении [11].

В первый день эксперимента была произведена инокуляция клеток 4 культур микроводорослей *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana и Chlorella sp.* в емкости, содержащие стерильную морскую воду и питательную среду. Далее, мы наблюдали рост культур и просчитывали численность микроводорослей (рис. 3).

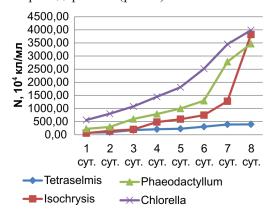


Рис. 3. Динамика численности микроводорослей в накопительных культурах

Из рисунка видно, что за время эксперимента максимальных значений численности достигли *Chlorella sp.* и *Isochrysis galbana*  $-39,85\cdot10^6$  кл/мл и  $38,18\times10^6$  кл/мл.

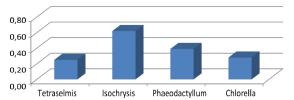


Рис. 4. Средняя удельная скорость роста микроводорослей за время эксперимента, сут-1

Максимальная удельная скорость роста клеток была отмечена в накопительной культуре микроводоросли *Isochrysis galbana и составила 0,62 сут*<sup>-1</sup> (рис. 4).

При достижении культурами достаточно высоких концентраций — на 8 сутки эксперимента — в емкости с микроводорослями была добавлена культура коловраток *Brachionus plicatilis*. Эксперимент был продолжен до тех пор, пока количество клеток водорослей в экспериментальных емкостях не снизилось до минимальных значений.

На рисунке 5 представлена динамика численности коловраток и изменение количества клеток водорослей, а на рисунке 6 — только динамика численности коловраток на различных культурах микроводорослей. Из графиков видно, что количество Brachionus plicatilis на всех культурах водорослей достигали практически одинаковых значений — 350-380 кол/мл.

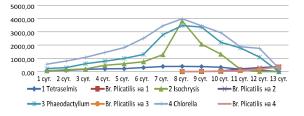
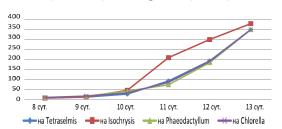


Рис. 5. Изменение численности микроводорослей  $(10^4 \, \kappa \text{л/мл})$  и коловраток  $(\kappa \text{ол/мл})$ 



Puc. 6. Динамика численности Br. plicatilis на микроводорослях, кол/мл

Средняя удельная скорость роста численности коловраток была максимальна в емкостях с культурой *Isochrysis galbana* – 1.035 сут<sup>-1</sup> (рис. 7).

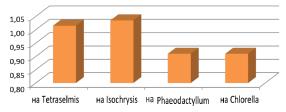
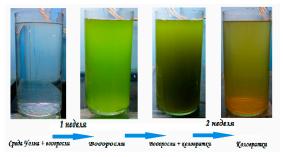


Рис. 7. Удельная скорость роста коловраток на микроводорослях (сут<sup>-1</sup>)

## Расчет затрат на реализацию проекта

Запущенный процесс бесперебойного культивирования коловраток на культуре водоросли Isochrysis galbana (объем культуры был увеличен до 10 л), позволил с успехом кормить всех беспозвоночных и молодь рыб, содержащихся в Севастопольском Аквариуме-музее (рис. 8, 9).



Puc. 8. Этапы получения культуры коловраток Br. plicatilis на микроводорослях



Рис. 9. Кормление беспозвоночных коловратками в Аквариуме

**Таблица 3** Стоимость реактивов для приготовления среды Уолна (на  $10^4$  л стерильной морской воды)

No	Реактив	Цена за кг, руб.	Потребность, г	Стоимость, руб.
1	NaNO <sub>3</sub>	120.00	1000	120.00
2	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> o	140.00	200	28.00
3	$H_3BO_3$	80.00	346	27.68
4	MnCl <sub>2</sub>	100.00	3.6	0.36
5	ТРИЛОН Б (ЭДТА)	230.00	450	103.50
6	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	65.00	13	0.85
7	CuSO <sub>4</sub>	150.00	200	30.00
8	CoCl,·6H,O	750.00	20	15.00
9	$(NH_4)_6 \cdot MoO_2 \cdot 4H_2O$	1700.00	90	153.00
10	Витамин В1	1689/500мг	0.003	5.00
11	Витамин В12	980/1000мкг	0.0006	1.00
ИТОГО		484.40		

Расход на 10 л среды/неделю – 0.50 руб.

# Таблица 4 Стоимость расходных материалов

№	Расходный материал	Цена, руб.	Потребность в год	Стоимость, руб.
1	Фильтр мембранный ФМАЦ- 0,45, 90 мм, размер пор 0,45 мкм	2 400/50 шт.	50 шт.	2 400
2	$\Pi$ /э пакеты $60 \times 80$ , толщина $90 \text{ мкм}$	1 620/100 шт.	100 шт.	1 620
3	Лампа люминесцентная OSRAM FLUORA L 18W/77	585	4 шт.	2 340
4	Спирт медицинский, 96%	300	1 л	300
5	Электроэнергия	3,40 за кВт.ч	643кВт.ч	2 185
ИТОГО		8 785		

Чтобы обеспечить прирост биомассы микроводорослей и бесперебойное получение живого корма для гидробионтов Аквариума был составлен перечень необходимого оборудования и расходных материалов (табл. 3 и 4). Всего затрат — 8 810 руб./год

#### Заключение

Таким образом, в результате исследования получены следующие результаты:

- 1. Для культивирования микроводорослей нами был использован накопительный режим, который позволил в течение 8 суток получить высокие численности микроводорослей: начальная концентрация водорослей составляла 74 · 104, 61,75 · 104, 225,8×  $\times$  104, 560  $\cdot$  104 кл/мл для микроводорослей Tetraselmis suecica, Isochrysis galbana, Phaeodactylum tricornutum и Chlorella sp. соответственно. В процессе роста микроводорослей произошло увеличение концентрации клеток до следующей плотности, соответственно 395,83 · 104, 3818,33 · 104, 3466,67 · 104, 3985 · 104 кл/мл для *Tetraselmis* suecica, Isochrysis galbana, Phaeodactylum tricornutum и Chlorella sp. Биомасса Tetraselmis suecica увеличилась с 0,037 мг/мл до 0.2 мг/мл, Isochrysis galbana – с 0.002 до 0,149 мг/мл, Phaeodactylum tricornutum – с 0,026 до 0,392 мг/мл, Chlorella sp. – с 0,008 до 0,056 мг/л. То есть, все 4 культуры микроводорослей Isochrysis galbana, Chlorella sp., Phaeodactylum tricornutum и Tetraselmis suecica могут быть использованы для получения накопительных культур высокой плотности.
- 2. Максимальную удельную скорость роста показала культура микроводоросли *Isochrysis galbana* 0,62 сут<sup>-1</sup>.
- 3. На 8 сутки эксперимента в емкости культурами микроводорослей были добавлены коловратки Brachionus plicatilis следующих количествах: кол/мл к водорослям Tetraselmis suecica и sochrysis galbana, 9 кол/мл – к водорослям Phaeodactylum tricornutum и Chlorella. В конце эксперимента, количество сутки, коловраток увеличилось до следующих значений: 350 кол/мл в емкостях с водорослями *Tetraselmis* suecica, Isochrysis galbana и Chlorella sp, 380 кол/мл – с Phaeodactylum tricornutum. Таким образом, все культуры микроводорослей могут быть использованы практически с равным успехом для выращивания коловраток Brachionus plicatilis и получения живого корма для кормления гидробионтов, содержащихся в искусственных экосистемах Севастопольского морского Аквариума-музея.
- 4. Максимальное значение удельной скорости роста коловраток было получено для микроводоросли *Isochrysis galbana* и

- составило 1,035 сут<sup>-1</sup>. Таким образом, эта микроводоросль наиболее предпочтительна для получения полноценного живого корма с наименьшими временными затратами.
- 5. Расчет проекта и его успешная апробация по получению коловраток в лаборатории Севастопольского морского Аквариума-музея показали, что расход денежных средств составит около 9 000 руб./год.

#### Список литературы

- 1. Акропора морской коралл. Условия выращивания коралла Акропора в аквариуме. http://domznaniy.info/akropora-morskoj-korall.html.
- 2. Безрук А. Кормление кораллов http://aqualog.ru/topic/5533-kormlenie-korallov/.
- 3. Виноградов А. К. Как пополнить кладовые Нептуна! – М.: «Пищевая промышленность», 1978.-208 с.
- 4. Галковская Г. А. Эколого-биологические основы массового культивирования коловраток / Г. А. Галковская, И. Ф. Митянина, В. А. Головчиц. Минск: Наука и техника, 1988. 143 с.
- 5. Заика В. Е. Сравнительная продуктивность гидробионтов / В. Е. Заика; АН УССР, Ин-т биологии юж. морей им. А. О. Ковалевского. К. : Наук. думка, 1983. 208 с.
- 6. Культивирование коловраток в Европе. http://aquavitro.org/2013/05/21/kultivirovanie-kolovratok-brachionus-plicatilis-v-evrope/
- 7. Куницын М.В. Хлорелла будущее птицеводства / Журнал «Птицеводство», №4, М: ООО «Авиан», 2009. С. 11 13.
- 8. Маллаалиева А. Хлорелла это... Водоросль хлорелла http://fb.ru/article/239139/hlorella.
  - 9. Микулин А.Е. Живые корма. М: «Дельфин», 1994. 104 с.
- 10. Национальный стандарт Российской Федерации. Вода – ГОСТ Р 54496-2011.
- 11. Рауэн Т.В. Дисс. на соискание науч. степени канд. биол. наук. Взаимодействие живых компонентов в системе искусственного воспроизводства черноморского калкана. Севастополь, ИнБЮМ им А.О. Ковалевского, 2014. 130 с.
- 12. Рауэн Т. В. Влияние микроводорослей и их фильтратов на численность бактерий в среде выращивания камбалы калкана / Т. В. Рауэн, А. Н. Ханайченко, В. С. Муханов // Мор. экол. журн. -2011. T.10, № 3. C. 48–56.
- 13. Рауэн Т.В., Муханов В.С., Ханайченко А.Н. Продукционные показатели коловраток Brachionus Plicatilis при питании микроводорослями разных таксономических групп / «Морской экологический журнал», том 11, №3. Севастополь: ИнБЮМ им. А.О. Ковалевского, 2012. с. 89 97.
- 14. Руководство по гидробиологическому мониторингу пресноводных экосистем / Под ред. Абакумова В.А.-СПб.: Гидрометеоиздат, 1992.-318 с.
- 15. Ханайченко А. Н. Питание и продуцирование коловраток в экспериментальных популяциях при комбинированном воздействии температуры и трофических условий (на примере Brachionus plicatilis Muller, 1786): автореф. дис. на соискание науч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.17 «Гидробиология» / А. Н. Ханайченко. Минск; Севастополь, 1988. 24 с.
- 16. Холодов В.И., Пиркова А.В., Ладыгина Л.В. Выращивание мидий и устриц в
- 17. Черном море / под. ред. В.Н. Еремеева; Национальная академия наук Украины,
- 18. Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского. Севастополь,  $2010.-422~{\rm c}.$
- 19. Wikipedia. https://en.wikipedia.org/wiki/Phaeodactylum\_tricornutum.