

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО РЫБОЛОВСТВУ**



**Дальневосточный государственный технический  
рыбохозяйственный университет**

## **Актуальные проблемы освоения биологических ресурсов Мирового океана**

**Материалы VII Международной  
научно-технической конференции**

(Владивосток, 19–20 мая 2022 года)

Электронное издание

Проблемы и актуальные вопросы освоения водных биологических  
ресурсов Мирового океана

Вопросы безопасности мореплавания и технического обслуживания судов

Инновации в технологических, проектных и инженерных решениях  
для развития пищевых и холодильных производств и управления  
качеством продуктов из водных биологических ресурсов

Владивосток  
Дальрыбвтуз  
2022

УДК 639.2.053  
ББК 47.2  
А43

### Организационный комитет:

*Председатель* – О.Л. Щека, доктор физ.-мат. наук, профессор, ректор ФГБОУ ВО «Дальрыбвтуз».  
*Зам. председателя* – О.И. Шестак, канд. ист. наук, доцент, начальник научного управления.

А.Н. Бойцов, канд. техн. наук, доцент, директор Института рыболовства и аквакультуры;  
С.Б. Бурханов, канд. экон. наук, доцент, директор Мореходного института;  
Е.П. Лаптева, канд. техн. наук, доцент, директор Института пищевых производств;  
С.Н. Максимова, доктор техн. наук, профессор, зав. кафедрой «Технология продуктов питания»;  
И.В. Матросова, канд. биол. наук, доцент, зав. кафедрой «Водные биоресурсы и аквакультура»;  
И.А. Круглик, канд. биол. наук, доцент, зав. кафедрой «Экология и природопользование»;  
С.В. Лисиенко, канд. экон. наук, доцент, зав. кафедрой «Промышленное рыболовство»;  
Д.К. Глазюк, канд. техн. наук, доцент, зав. кафедрой «Судовые энергетические установки»;  
И.С. Карпушин, канд. техн. наук, доцент, зав. кафедрой «Судовождение»;  
Э.Н. Ким, доктор техн. наук, профессор, зав. кафедрой «Управление техническими системами»;  
Т.И. Ткаченко, канд. техн. наук, доцент, зав. кафедрой «Технологические машины и оборудование»;  
В.В. Кращенко, канд. техн. наук, доцент, зав. кафедрой «Пищевая биотехнология»;  
В.П. Шайдуллина, канд. техн. наук, доцент, зав. кафедрой «Холодильная техника, кондиционирование и теплотехника»;  
С.С. Валькова, канд. техн. наук, доцент, зав. кафедрой «Эксплуатация и управление транспортом»;  
Е.Н. Бауло, канд. техн. наук, доцент, зав. кафедрой «Электроэнергетика и автоматика»;  
Д.В. Полещук, канд. техн. наук, доцент кафедры «Технология продуктов питания», председатель совета молодых ученых;  
Л.А. Харитоновна – директор центра публикационной деятельности «Издательство Дальрыбвтуза».

*Ответственный секретарь* – Е.В. Денисова, зам. начальника научного управления.

*Технический секретарь* – Е.Ю. Образцова, главный специалист научного управления.

**А43 Актуальные проблемы освоения биологических ресурсов Мирового океана** : материалы VII Междунар. науч.-техн. конф. [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. (50,6 Mb). – Владивосток : Дальрыбвтуз, 2022. – 423 с. – Систем. требования : PC не ниже класса Pentium I ; 128 Mb RAM ; Windows 98/XP/7/8/10 ; Adobe Reader V8.0 и выше. – Загл. с экрана.

ISBN 978-5-88871-757-8

Представленные материалы охватывают международные научно-технические проблемы экологии, рационального использования, сохранения и восстановления ресурсно-сырьевой базы рыболовства, развития искусственного воспроизводства и аквакультуры, эксплуатации водного транспорта, обеспечения безопасности мореплавания, прогрессивных технологий в области судовых энергетических установок и судовой автоматизации, развития пищевых и холодильных производств, технологии и управления качеством продуктов из водных биологических ресурсов.

Приводятся результаты научно-исследовательских разработок ученых Дальрыбвтуза, других вузов и научных организаций России и зарубежья.

УДК 639.2.053  
ББК 47.2

ISBN 978-5-88871-757-8

© Дальневосточный государственный  
технический рыбохозяйственный  
университет, 2022

**Людмила Анатольевна Боцун**

Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук, аспирант, ORCID ID: 0000-0002-2098-3951, SPIN: 2283-7592, Россия, Владивосток, e-mail: 3615-x@mail.ru

**Жанна Васильевна Маркина**

Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук, научный сотрудник, ORCID ID: 0000-0001-7135-1375, SPIN: 7056-0032, Россия, Владивосток, e-mail: zhannav@mail.ru

**Сергей Иванович Масленников**

Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук, старший научный сотрудник, канд. биол. наук, доцент, ORCID ID: 0000-0003-4776-0624, SPIN: 9151-6468, Россия, Владивосток, e-mail: 721606@mail.ru

**Методика быстрого определения численности культур  
микроводорослей в аквакультуре**

*Аннотация.* В настоящее время интенсивное культивирование микроводорослей применяется для производства биологически активных добавок, повышения продуктивности водоемов и удобрения почвы. Водоросль рода *Tetraselmis* (Chlorophyta) широко используется в кормовых целях в аквакультуре. Применение методики «зеленой воды» с этим родом показывают отличные результаты по выживаемости культивируемых гидробионтов. Однако неизвестна численность и оптическая плотность клеток микроводорослей, при которой проявляется пробиотический эффект. В нашем исследовании мы построили калибровочную кривую и получили уравнение регрессии для вычисления численности клеток по оптической плотности культуры одноклеточной микроводоросли *Tetraselmis* sp.

*Ключевые слова:* микроводоросли, культивирование, численность, оптическая плотность, *Tetraselmis*.

**Liudmila A. Botsun**

A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Postgraduate Student, ORCID ID: 0000-0002-2098-3951, SPIN: 2283-7592, Russia, Vladivostok, e-mail: 3615-x@mail.ru

**Zhanna V. Markina**

A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Researcher, ORCID ID: 0000-0001-7135-1375, SPIN: 7056-0032, Russia, Vladivostok, e-mail: zhannav@mail.ru

**Sergei I. Maslennikov**

A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Senior Research Officer, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, ORCID ID: 0000-0003-4776-0624, SPIN: 9151-6468, Russia, Vladivostok, e-mail: 721606@mail.ru

## A method for rapid determination of the abundance of microalgae cultures in aquaculture

**Abstract.** Currently, intensive cultivation of microalgae is used for the production of dietary supplements, increasing the productivity of water bodies and fertilizing the soil. The algae of the genus *Tetraselmis* (Chlorophyta) is widely used as feed in aquaculture. The use of the "green water" technique with this genus shows excellent results in terms of the survival of cultivated aquatic organisms. However, the number and optical density of microalgae cells, at which the probiotic effect is manifested, is unknown. In our study, we built a calibration curve and obtained a regression equation for calculating the number of cells from the optical density of a culture of unicellular microalgae *Tetraselmis* sp.

**Keyword:** microalgae, cultivation, number, optical density, *Tetraselmis*.

Морская зеленая микроводоросль рода *Tetraselmis* (Chlorophyta) широко используется в биотехнологии и марикультуре. Ее ценность определяется содержанием биологически активных веществ, необходимых для полноценного развития и жизни гидробионтов [1]. В аквакультуре используется с целью кормления личиночных стадий креветок, мидий, устриц, рыбы и др. [2]. В микроводоросли содержится высокий уровень полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) омега-3,  $\alpha$ -линоленовая кислота, пальмитиновая кислота, полисахариды, стерины, витамины, каротиноиды и др. Водоросль обладает антимикробной и противовоспалительной активностью [3, 4]. В условиях экспериментальных и промышленных технологических циклов необходим метод для быстрого подсчета численности клеток микроводорослей. Классическим методом является подсчет клеток в счетных камерах (Нажотта, Горяева, Седвика-Рафтера и др.) под микроскопом. Однако он занимает много времени [5, 6]. В последнее десятилетие появились портативные спектрофотометры, особенностью которых является возможность проводить измерения мощности в любом направлении от источника излучения. Использование такого класса приборов позволяет проводить измерения как в лабораторных, так и в полевых условиях [7].

Цель нашей работы заключалась в построении уравнения для подсчета клеток микроводорослей рода *Tetraselmis* sp. в условиях массового производства биомассы микроводорослей.

Работа проводилась в аквариальной ННЦМБ ДВО РАН. Маточная культура микроводоросли *Tetraselmis* sp. была взята со станции МБС «Запад». Культура в эксперименте росла на питательной среде *f*, приготовленной на фильтрованной, стерилизованной морской воде соленостью 32 ‰. Свето-темновой режим 12/12 под диодной лампой 2500 Лк. Температура составляла в среднем 21 °С. При постановке эксперимента использовали 250 мллитровые колбы Эрленмейера с объемом культуральной среды 200 мл (рис. 1). В качестве инокулята использовали культуру на экспоненциальной стадии роста. Продолжительность эксперимента составляла 28 сут. Пробы для подсчета клеток и определения оптической плотности отбирали на 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18, 21, 23, 25 и 28 сут опыта.

Подсчет численности клеток производили на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Для анализа в течение каждого измерения записали 20000 событий (регистрируемых в пробе частиц). Выбор клеток водорослей из общего числа событий, регистрируемых цитометром, проводили по флуоресценции хлорофилла *a*. Интенсивность флуоресценции хлорофилла *a* регистрировали на длине волны 690 нм, длина волны возбуждения составляла 488 нм (для проточного цитометра CytoFLEX канал регистрации данных – РС 5.5).

Определение оптической плотности на длине волны 750 нм ( $OD_{750}$ ) проведено с помощью спектрофотометра ПЭ-5400ВИ (Экрос, Россия) в стеклянных кюветах с оптическим путем 10 мм (рис. 2). Эксперименты проведены в трех биологических повторностях. В таблице и на графике представлены средние значения (таблица, рис. 2). Статистическую обработку выполняли с помощью программы Excel.

Численность клеток определяли на лаг-фазе, экспоненциальной и стационарной фазах роста культуры. Минимальная численность *Tetraselmis* sp. составляла  $25,3 \times 10^3$  кл/мл, максимальная –  $3750,9 \times 10^3$  кл/мл, средняя –  $2139 \times 10^3$  кл/мл (таблица).

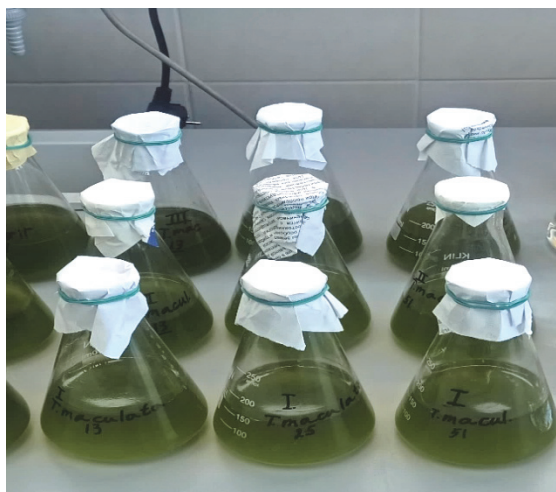


Рисунок 1 – Колбы с культурой *Tetraselmis* sp.



Рисунок 2 – Измерение на оптической плотности на спектрофотометре Экрос

Средняя численность и плотность клеток по дням эксперимента

День	Численность, кл/мл	Оптическая плотность, ед.
0	25,386	0,0158
2	32,249	0,0277
4	104,412	0,0668
7	460,466	0,2407
9	1150,969	0,4447
11	2976,833	0,6248
14	2710,666	0,7708
16	2976,833	0,8018
18	2660,814	0,8731
21	3698,108	0,9971
23	3261,486	0,9277
25	3998,411	1,0209
28	3750,998	1,2547

Зависимость лучше всего аппроксимируется линейным уравнением с коэффициентом достоверности 93 % ( $R^2$ ), что говорит о достоверности использования спектрофотометрического метода для определения численности клеток *Tetraselmis* sp. На рис. 3 представлена калибровочная кривая для определения численности клеток по данным спектрофотометрии.

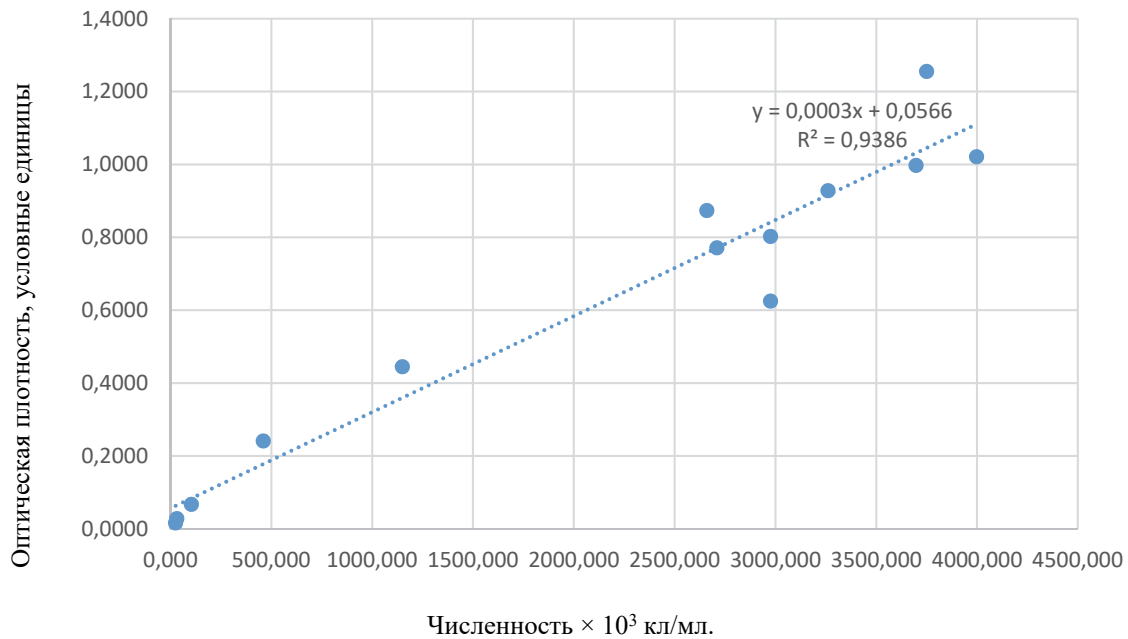


Рисунок 3 – Калибровочная кривая для *Tetraselmis* sp.

Нами получено уравнение  $y=ax+b$ , где  $y$  представляет численность клеток  $\times 10^3$  в мл,  $a$  и  $b$  – коэффициенты, указанные в таблице,  $x$  – оптическая плотность, измеренная на длине волны 750 нм.

Таким образом, нами адаптирован спектрофотометрический метод для определения численности клеток *Tetraselmis* sp. Высокий коэффициент корреляции подтверждает точность данного метода.

**Финансирование работы.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 21-74-30004).

### Библиографический список

1. Железнова С.Н., Малахов А.С., Геворгиз Р.Г. Измерение спектра поглощения плотных культур бентосных микроводорослей // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2019. Т. 4, №. 4. С. 463–466.
2. Жондарева Я.Д., Тренкеншу Р.П. Рост *Tetraselmis viridis* (Rouchijajnen) в тепличном бассейне при естественном освещении и аэрации воздухом // Вопр. современной альгологии. 2019. № 3(21). С. 76–87.
3. Лукьянов В. Микроводоросли. <https://microalgae.ru/microalgae> (дата обращения: 04.05.2022).
4. Cardoso C., Pereira H., Franca J., Matos J., Monteiro I., Pousão-Ferreir, P., Bandarra N. M. Lipid composition and some bioactivities of 3 newly isolated microalgae (*Tetraselmis* sp. IMP3, *Tetraselmis* sp. СТР4, and *Skeletonema* sp.) // Aquaculture International, 2020. Vol. 28(2). P. 711–727.
5. Franklin N.M., Stauber J.L., Lim R.P. Development of flow cytometry-based algal bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters // Envir. Toxicol. Chem. 2001. Vol. 20. P. 160–170.
6. Günerken E., Hondt E.D., Eppink M. et al. Flow cytometry to estimate the cell disruption yield and biomass release of *Chlorella* sp. during bead milling // Algal Research. 2017. Vol. 25. P. 25–31.
7. Plaza M., Herrero M., Cifuentes A. Innovative natural functional ingredients from microalgae // Journal of agricultural and food chemistry. 2009. Vol. 57(16). P. 7159–7170.