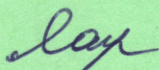


НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ
им. А. О. КОВАЛЕВСКОГО

ТРОВ 2010

ЛАДЫГИНА
ЛЮДМИЛА ВЛАДИМИРОВНА



УДК 582.232: 579.8

МИКРОВОДОРОСЛИ КАК КОРМОВЫЕ ОБЪЕКТЫ
ЛИЧИНОК МИДИЙ И УСТРИЦ

03.00.17 – гидробиология

Автореферат
диссертации на соискание научной степени
кандидата биологических наук

Севастополь – 2007

Диссертация является рукописью

Работа выполнена в Институте биологии южных морей
им. О. А. Ковалевского НАН Украины, г. Севастополь

Научный руководитель: кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
Иванов Валерий Николаевич,
Институт биологии южных морей
НАН Украины, заведующий отделом
марикультуры и прикладной океанологии

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
Паршикова Татьяна Викторовна,
Киевский национальный университет
им. Тараса Шевченко,
заведующая кафедрой физиологии и
экологии растений

доктор биологических наук,
Рябушко Виталий Иванович,
Институт биологии южных морей НАН Украины,
заведующий отделом биологического тестирования

Ведущая организация: Одесский национальный университет им. И.И.Мечникова

Защита диссертации состоится « 6 » июня 2007 г. в 14 часов на заседании
специализированного ученого совета Д 50.214.01 при Институте биологии южных морей

НАН Украины, Севастополь, ул. Мечникова, 2

орей

И. Гаевская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. За последние десятилетия структура и численность природных популяций двустворчатых моллюсков в Черном море претерпели значительные изменения (Иванов, 1976., Хребтова, 1986). В 70-е годы XX века снизилась численность черноморской устрицы *Ostrea edulis* (L.), которая из массового вида перешла в разряд редкого, исчезающего и была занесена в Красную книгу СССР, а затем Украины и России. Поэтому в настоящее время не приходится говорить о промышленных запасах двустворчатых моллюсков, а их добыча не оправдана ни с экономической, ни с экологической точек зрения (Ivanov, 1992).

С начала 70-х годов в Украине начала интенсивно развиваться марикультура мидии *Mytilus galloprovincialis* (Lam.), а с 80-х годов – тихоокеанской устрицы *Crassostrea gigas* (Th.), интродуцированной в Черное море из Дальнего Востока взамен исчезающей *O. edulis*. Тихоокеанская устрица является основным объектом культивирования в мировом устрицеводстве, что во многом обусловлено её экологической пластичностью, устойчивостью к заболеваниям, хорошими вкусовыми качествами и высокими темпами роста (Grisel, 2001). Однако в Чёрном море этот моллюск всё ещё очень редок, и естественных банок не образовал, поэтому технология его разведения должна базироваться на производстве молоди в устричных питомниках. Выращивание личинок и молоди в питомниках позволяет проводить селекционную работу, значительно повысить выживаемость моллюсков, а также увеличить эффективность работы морских хозяйств.

Эффективность выращивания личинок в питомнике во многом зависит от особенностей их питания. Основным видом корма для производителей, личинок и спата мидий и устриц являются микроводоросли. Их пищевая ценность определяется количественным и качественным составом, однако данные о трофических потребностях личинок мидий и устриц отсутствуют.

Создание на базе Института биологии южных морей питомника по выращиванию личинок мидий и устриц, привело к необходимости модернизации биотехники культивирования микроводорослей, направленной, прежде всего, на определение оптимальных уровней концентрации водорослей и плотности посадки личинок на разных стадиях развития. Особую актуальность эти работы приобретают в связи с необходимостью разработки практических рекомендаций для промышленного получения больших биомасс микроводорослей, используемых в качестве корма для личинок и спата двустворчатых моллюсков, выращиваемых в питомнике.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Диссертация выполнена в отделе марикультуры и прикладной океанологии ИнБЮМ НАН Украины в рамках плановых исследований по бюджетным темам: «Моделирование естественных и искусственных экосистем в целях прогнозирования ресурсов и обоснование методов марикультуры» (№ государственной регистрации 0182.8027773, 1981 – 1985 гг.); «Физиолого-биохимические основы продуцирования вещества для создания современной марикультуры» (№ государственной регистрации 0187.0012496, 1986 – 1996

гг.); «Изучить общие эколого-продукционные процессы мелиорации среды и марикультуры в прибрежных районах Черного моря» (№ государственной регистрации 0196U022106, 1996 – 1999 гг.); «Структурно-функциональные основы биоразнообразия морских сообществ» (№ государственной регистрации 0199U001388, 1999 – 2002 гг.); «Разработка научных основ биотехнологий воспроизводства и использования морских ресурсов» (№ государственной регистрации 0101U001448, 2001 – 2005 гг.); «Изучение функционирования морских биотехнологических комплексов и их взаимодействие с окружающей средой» (№ государственной регистрации 0106U001586, 2006 – 2010 гг.); по теме ГКНТ: «Разработать и осуществить комплекс биотехнических мероприятий по выращиванию черноморских водорослей (филлофора), моллюсков (мидий, устриц) и рыб (камбалы-калкана): определить научные основы создания фермерских хозяйств для их культивирования» (03.04.07/020-92; 03.04.00/022к-95; 1992 – 1996гг). Автор участвовала в перечисленных темах в качестве исполнителя.

Цель и задачи исследования. Цель работы – оптимизировать условия питания личинок устрицы *Crassostrea gigas* и мидий *Mytilus galloprovincialis* при выращивании в питомнике. Для достижения намеченной цели были поставлены задачи:

- выявить трофические потребности личинок мидий и устриц;
- определить качественный и количественный состава корма для личинок;
- составить пищевые рационы для личинок устриц и мидий;
- подобрать оптимальные условия для массового культивирования микроводорослей – корма для личинок;
- выбрать оптимальный режим выращивания личинок устриц и мидий в контролируемых условиях.

Объект исследования. Личинки устрицы *C. gigas* и мидий *M. galloprovincialis*; культуры одноклеточных микроводорослей *Isochrysis galbana*, *Monochrysis lutheri*, *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella viridis*, *Phaeodactylum tricornerutum*, *Chaetoceros calcitrans*.

Предмет исследования. Влияние качественного состава корма на рост личинок двустворчатых моллюсков; ростовые и биохимические характеристики кормовых видов микроводорослей.

Методы исследования. В работе использовались апробированные в гидробиологии и биохимии методики, фотоколориметрические и спектрофотометрические методы определения содержания белка, углеводов, липидов и каротиноидов; общепринятые методы определения биомассы и скорости роста микроводорослей.

Научная новизна полученных результатов. Впервые в питомнике апробированы элементы биотехники массового культивирования микроводорослей - корма для личинок мидий и устриц, в проточном и накопительном режимах. Определены скорость роста и динамика накопления урожая микроводорослей в зависимости от фазы роста и условий

культивирования. Впервые исследовано накопление каротиноидов личинками устриц и показана их трансформация устричным спатом в процессе роста. Выявлены трофические потребности личинок мидий и устриц. Впервые составлены пищевые рационы для личинок устриц и мидий в зависимости от стадий развития, с учетом количественного и качественного состава микроводорослей.

Практическое значение полученных результатов. Результаты исследований вносят существенный вклад в решение проблемы разведения двустворчатых моллюсков в контролируемых условиях. Полученные результаты успешно адаптированы при организации на базе ИнБЮМ устричного питомника, а также в проведении селекционных работ с двустворчатыми моллюсками. Оптимизация биотехники культивирования кормовых видов микроводорослей позволит получать большие биомассы водорослей заданного биохимического состава в полупромышленных масштабах. Выявленные трофэкологические особенности личинок мидий и устриц дают возможность получать жизнестойкую молодь в питомниках для удовлетворения потребностей развивающейся мариккультуры моллюсков в Украине.

Личный вклад соискателя. Диссертационная работа является самостоятельным научным исследованием. На базе устричного питомника ИнБЮМ НАНУ автором организован блок полупромышленного культивирования кормовых видов водорослей. Весь комплекс экспериментальных работ по культивированию микроводорослей, определению их морфологических и биохимических показателей, анализ и обобщение результатов выполнены автором самостоятельно. В работах, опубликованных в соавторстве, вклад соискателя состоял в обсуждении целей и задач исследований, проведении экспериментов, анализе результатов экспериментов и обобщении полученных данных. Из статей, опубликованных в соавторстве, в диссертации использованы только данные, полученные автором. Права соавторов публикаций не нарушены.

Апробация работы. Результаты исследований были представлены на: научной конференции «Состояние и перспективы научно - практических разработок в области мариккультуры» (Ростов-на-Дону, 1996), 2-ом Гидроэкологическом съезде (Киев, 1997), Четвертом (тринадцатом) совещании по изучению моллюсков (наземных, пресноводных и морских) «Моллюски: проблемы систематики, экологии и филогении» (Санкт-Петербург, 1998), Всеукраинской научно-практической конференции «Моллюски. Основные результаты, проблемы и перспективы» (Житомир, 2002), Международной конференции «Эволюция морских экосистем под влиянием вселенцев и искусственной смертности фауны» (Ростов-на-Дону, 2003), III Международной конференции «Морские технологии: проблемы и решения - 2004» (Керчь, 2004), III Международной конференции «Актуальные проблемы современной альгологии» (Харьков, 2004), IV Международной конференции «Морские технологии: проблемы и решения - 2005» (Керчь, 2005), III Международной конференции «Моллюски: Результаты, проблемы, и перспективы исследований»

(Житомир, 2006), IX Международной научно-практической конференции «Современные проблемы популяционной экологии» (Белгород, 2006).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 24 работы (пять без соавторов), из них 17 статей в специализированных научных изданиях, рекомендованных ВАК Украины, 7 работ – в научных сборниках, материалах и тезисах национальных и международных конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 165 страницах машинописного текста; состоит из 8 разделов, выводов, списка использованной литературы и трех приложений. Текст диссертации содержит 25 таблиц и 32 рисунка. Список использованных источников включает 187 наименований, том числе иностранных -111.

МИКРОВОДОРОСЛИ - ОСНОВА СОЗДАНИЯ ПИЩЕВЫХ ЦЕПЕЙ В АКВАКУЛЬТУРЕ

Рассмотрены современные представления о роли микроводорослей в аквакультуре. Дана характеристика водорослей, используемых в качестве корма для двустворчатых моллюсков, показана их пищевая ценность. Отмечено, что живые микроводоросли являются единственным оптимальным кормом для выращиваемых личинок, не смотря на то, что найдены альтернативные корма, такие как дрожжи, бактерии, водорослевые пасты или концентраты.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена в 1998-2006 гг. на базе устричного питомника отдела марикультуры ИнБИОМ. Процесс культивирования микроводорослей в питомнике включает хранение коллекции кормовых видов водорослей, подготовку стартовых культур и массовое культивирование микроводорослей.

Стартовые культуры наращивали в колбах объемом 2 л в накопительном режиме при температуре 22-24°C и постоянной аэрации. В качестве питательной среды использовали среду Конвея (Walne, 1966) в собственной модификации. Для освещения использованы люминесцентные лампы LD-40. Культуры водорослей предварительно адаптировали к нескольким уровням интенсивности света в диапазоне 17,2, 86 и 172 мкЕ м⁻² с⁻¹.

Концентрацию клеток в культурах определяли с помощью камеры Горяева под микроскопом МБИ - 6 (x 175) в трех повторностях. Удельную скорость роста микроводорослей (μ) рассчитывали по уравнению: $\mu = \lg C_t - \lg C_0 / t \cdot \lg 2$ (C_0 и C_t концентрации в начальный момент времени и через t суток) (Стейниер, 1983). Зависимость скорости роста микроводорослей от интенсивности света описывали уравнением: $Y = c \cdot \tanh ((b \cdot x)/c)$. Величину сырой биомассы (B) водорослей определяли по формуле: B (мг/л) = $V_{кл} \cdot C$, где V – объем клетки, C - концентрация (Сеничкина, 1978, 1995).

Массовое культивирование микроводорослей проводили в закрытых культиваторах (полиэтиленовые мешки) объемом 18 л на среде Конвея, при интенсивности света 172 мкЕ м⁻² с⁻¹, температуре 24°C и круглосуточной аэрации с добавлением 2% CO₂. Культивирование микроводорослей проводили в накопительном и проточном режимах. Продуктивность водорослей (P) и

удельную скорость роста (μ) определяли по уравнениям: $P = \mu_m \cdot V$, $\mu = \mu_m$ - для логарифмической фазы роста; $P = P_m$, $\mu = P_m / V$ - для линейной фазы роста; $P = \mu_m \cdot (V_m - V)$, $\mu = P \cdot (V_m - V) / V$ - для фазы замедления роста (P_m - величина максимальной продуктивности; μ_m - величина максимальной удельной скорости роста; V_m - величина максимальной биомассы). Прирост биомассы в

проточной культуре описывали уравнением: $Q = \frac{\bar{V}_k}{V_k}$ (Q - коэффициент

разбавления; \bar{V}_k - плотность культуры до разбавления; V_k - плотность культуры после разбавления (Перт, 1978; Тренкеншу, 2005).

Биохимический анализ водорослей проводили на пробах в логарифмической фазе, в фазе замедления роста и в конце стационарной фазы роста. Массовую долю белка, липидов и углеводов в сухом веществе (%) определяли фотоколориметрическими методами. Содержание общего белка анализировали по Лоури (Lowry, 1951), липидов - при помощи фосфорнованилинового реактива (Ahlglén, 1991), углеводов - по цветной реакции с L-триптофановым реактивом (Методы, 1988). Качественное и количественное содержание каротиноидов в микроводорослях и в личинках устриц анализировали по методике (Карнаухов, 1988; Repeta, 1997). Фракции каротиноидов идентифицировали по хроматографическим показателям (R_f) и спектральным характеристикам пигментов (Repeta, 1997). Концентрацию каротиноидов определяли по оптической плотности экстрактов в области 450 нм на спектрофотометре «Спекол-10», с использованием коэффициентов удельной экстинкции (Johansen, 1974; Jeffery, 1997).

Эксперименты по изучению плотности посадки личинок, концентрации корма и составу микроводорослей поставлены по методу латинского квадрата 4×4 . Опыты проводили с личинками на стадии велигера при температуре 21°C и с личинками на стадии великонхи при температуре 25°C продолжительностью соответственно 3 и 4 суток. На первом этапе эксперимента были заданы следующие уровни факторов: плотность посадки личинок 5, 10, 15 и 20 тыс. лич./л; на втором этапе - 3, 5, 7 и 9 тыс. лич./л; суммарная концентрация корма составила - 50, 100, 150 и 200 тыс. кл./мл (Пиркова, 2004).

Скорость потребления пищи личинками устриц и мидий определяли по формуле: $R = \frac{C_c + C_e}{L \cdot H}$ (R - скорость потребления, кл/лич. в час; C_c и C_e - концентрация микроводорослей в контроле и опыте; L - количество личинок в 1 мл; H - продолжительность опыта) (Fritz, 1984). Продолжительность переваривания микроводорослей личинками устриц изучали с помощью люминесцентного микроскопа МЛ - 2А (x 154), используя шкалу (Lucas и Rangel, 1983). Для математической обработки данных ($N \pm i$; CV %; r - коэффициент корреляции) и построения графиков использовали пакеты компьютерных программ Excel и Grapher. Статистический анализ результатов факторного эксперимента проводили с использованием дисперсионного и регрессионного анализа.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

В разделе дана морфологическая характеристика шести видов микроводорослей, используемых в качестве корма для личинок мидий и устриц. Показано, что в результате адаптации микроводорослей, полученных из коллекций водорослей ИнБИОМ и IFREMER (Франция) к новым условиям культивирования, получены штаммы, отличающиеся по морфологическим характеристикам от исходных культур.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА РОСТ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

При массовом культивировании микроводорослей интенсивность процесса биосинтеза может быть увеличена при оптимальных уровнях факторов, влияющих на их рост и физиологическое состояние. К таким факторам относятся свет, температура, углеродное питание.

Свет. При выращивании микроводорослей *Isochrysis galbana*, *Dunaliella viridis*, *Chaetoceros calcitrans* при интенсивности света 17,2 ; 86 и 172 мкЕ м⁻² с⁻¹ и температуре 24°C кривые зависимости скорости роста водорослей от интенсивности света состояли из двух участков: а) скорость роста увеличивалась пропорционально увеличению интенсивности света; б) скорость роста увеличивалась незначительно или вообще не увеличивалась с повышением интенсивности света (рис.1).

Максимальные значения скорости роста микроводорослей были отмечены при увеличении освещенности от 86 до 140 мкЕ м⁻² с⁻¹ и составили соответственно 0,99 сут⁻¹, 0,92 сут⁻¹ и 0,18 сут⁻¹ для *I. galbana*, *C. calcitrans*, *D. viridis*, а коэффициент корреляции этих показателей - 0,90, 0,81 и 0,67 соответственно у названных видов.

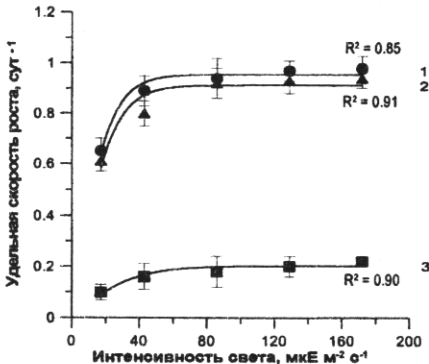


Рис. 1 Зависимость скорости роста микроводорослей от интенсивности света:

- 1- *Isochrysis galbana*,
- 2- *Chaetoceros calcitrans*,
- 3- *Dunaliella viridis*

Показано, что при интенсивности света 17,2 мкЕ м⁻² с⁻¹ стадия логарифмического роста продолжалась 35 суток. Максимальная концентрация клеток составила 5,83, 1,25 и 0,36 млн. кл/мл соответственно - у *I. galbana*, *D. viridis* и *C. calcitrans*. При интенсивности света 86 мкЕ м⁻² с⁻¹ стадия

логарифмического роста сократилась до 22 суток у *I. galbana* и *D. viridis* и до 26 - у *C. calcitrans*. Максимальные концентрации культуры увеличились до 15,85, 1,5 и 1,03 млн.кл/мл соответственно у *I. galbana*, *D. viridis* и *C. calcitrans*, а среднесуточный прирост составил $1,32 \times 10^6$, 10×10^4 и 8×10^4 кл/мл сут. При увеличении интенсивности света до $172 \text{ мкЕ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ фаза логарифмического роста длилась 16 суток - у *I. galbana* и *D. viridis* и 20 суток - у *C. calcitrans*. Максимальные концентрации культуры увеличились до 18,55, 1,8 и 1,23 млн. кл/мл соответственно у *I. galbana*, *D. viridis* и *C. calcitrans*.

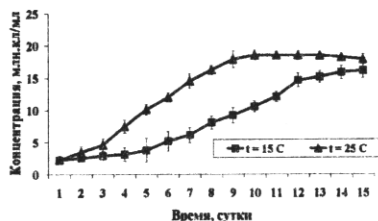
Отмечено, что у водорослей, принадлежащих к разным систематическим группам (золотистые, диатомовые, зеленые) интенсивность света, при которой начинается световое насыщение, практически не отличается. Так, световое насыщение у *I. galbana*, *D. viridis*, *C. calcitrans* наступает при $140 - 172 \text{ мкЕ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$.

Температура. В результате приспособления к различным температурным условиям микроводоросли претерпевают ряд изменений, которые касаются, в первую очередь, изменения скорости их роста. Микроводоросли *D. viridis*, *I. galbana* и *P. tricornutum* выращивали в накопительном режиме при температуре 15°C и 25°C (рис. 2).

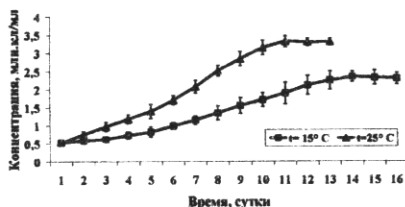
Наиболее интенсивный рост у *I. galbana* и *D. viridis* наблюдался при температуре 25°C . Максимальная концентрация водорослей составила соответственно 18,53 и 3,32 млн. кл/мл. Среднесуточный прирост при температуре 25°C был в два раза выше, чем при 15°C .

У диатомовой водоросли *P. tricornutum* наиболее высокая интенсивность деления клеток отмечена при температуре 15°C . Максимальное значение концентрации клеток составляло 59,06 млн. кл/мл, а среднесуточный прирост - 3,37 млн. кл/мл. сут., что в три раза выше, чем при 25°C .

Isochrysis galbana



Dunaliella viridis



Phaeodactylum tricornutum

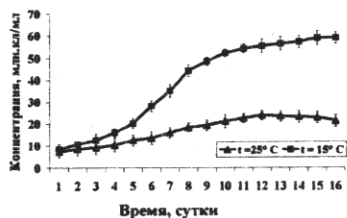


Рис. 2 Динамика роста микроводорослей при разной температуре

Углеродное питание водорослей. При массовом культивировании микроводорослей уровень углеродного питания увеличивали добавлением 2% CO₂. При выращивании *I. galbana* и *D. viridis* с продувкой воздуха (без добавления CO₂) максимальные концентрации водорослей составили 11,57 и 1,9 млн. кл/мл соответственно (рис. 3). При аэрации газовой смесью, содержащей 2% CO₂, обеспечивающей оптимальную pH среды (7,5 - 8,2), максимальные концентрации *I. galbana* и *D. viridis* увеличились соответственно до 14,58 и 2,96 млн. кл/мл. Среднесуточный прирост водорослей был в 5-3 раза выше, чем при выращивании без добавления углекислого газа.

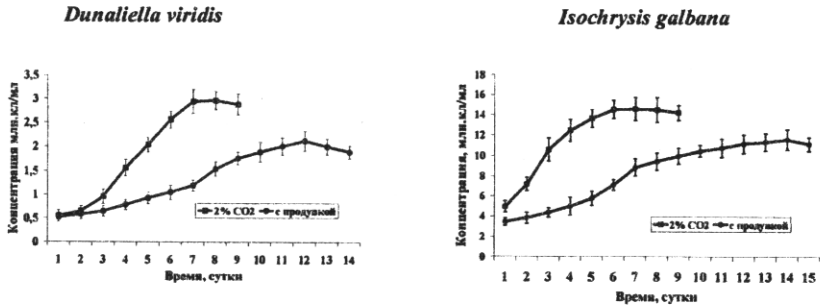


Рис. 3 Динамика роста микроводорослей в зависимости от углеродного питания

БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ КОРМОВЫХ ВИДОВ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Общий биохимический состава микроводорослей (белки, углеводы, липиды) определяли на трех стадиях развития: логарифмической, стадии замедления роста и стационарной стадии (табл.1).

Таблица 1

**Максимальное содержание белка, углеводов, липидов
в микроводорослях при накопительном культивировании**

Вид водорослей	Содержание, % СВ		
	белка*	углеводов**	липидов***
<i>Isochrysis galbana</i>	49,8 ± 1,21	40,7 ± 0,23	25,6 ± 0,09
<i>Dunaliella viridis</i>	37,1 ± 0,21	20,6 ± 0,13	18,0 ± 0,10
<i>Tetraselmis suecica</i>	30,4 ± 0,31	24,1 ± 0,08	20,9 ± 0,21
<i>Phaeodactylum tricornerutum</i>	40,7 ± 0,2	30,3 ± 0,10	20,0 ± 0,08
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	41,35±0,28	43,2 ± 0,08	27,0 ± 0,09

Примечание: * - логарифмическая фаза роста; ** - фаза замедления роста; *** - стационарная фаза роста

В логарифмической фазе отмечен высокий уровень белка у всех исследованных видов водорослей. Максимальное содержание белка составляло - 49,8 и 40,7 % соответственно - у *I. galbana* и *P. tricorutum*; а минимальное количество - 30,4% - у *T. suecica*. Доля углеводов варьировала от 15,2% - у *D. viridis* до 28,4 % - у *I. galbana*.

В фазе замедления скорости роста в клетках происходило значительное увеличение содержания углеводов и снижение содержания белка. Максимальное количество углеводов выявлено у *C. calcitrans* и *I. galbana* (43,2 и 40,7 %), а минимальное - у *D. viridis* (20,6%). Доля липидов варьировало от 7,3% - у *D. viridis* до 15,2% - у *I. galbana*.

В конце стационарной фазы роста микроводорослей установлено уменьшение содержания белка и углеводов в 1,5 - 2 раза и увеличение количества липидов в 2 - 2,5 раза соответственно у *I. galbana* и *C. calcitrans* и в 3 - 3,5 раза - у *T. suecica* и *P. tricorutum*. Оптимальный уровень азота (16,5 мг/л) в питательной среде Конвея способствовал интенсивному синтезу белка водорослями в логарифмической фазе роста. По мере развития культур (снижение скорости роста, увеличение концентрации клеток) происходило снижение концентрации нитратов в среде, что стало причиной уменьшения содержания белка и увеличения доли углеводов и липидов.

Фракционный состав каротиноидов в микроводорослях. Качественный и количественный состав каротиноидов исследован у четырех видов микроводорослей: *I. galbana*, *P. tricorutum*, *D. viridis* и *T. suecica*. Доминирующими фракциями каротиноидов у *D. viridis* и *T. suecica* были β -каротин, лютеин и ксантофиллы виолоксантинового ряда (неоксантин и виолоксантин). Микроводоросли *I. galbana* и *P. tricorutum*, несмотря на различное систематическое положение, имели сходный состав каротиноидов. Доминирующими фракциями каротиноидов у этих водорослей являются фукоксантин, β -каротин и диадиноксантин; *I. galbana* содержит слабо выраженную фракцию неоксантина.

Суммарное содержание каротиноидов в водорослях зависело от фазы роста. Максимальное их количество отмечено на стационарной фазе роста. У *I. galbana* содержание β -каротина в логарифмической фазе роста почти в два раза выше, чем в стационарной фазе - 317 мкг/г (СВ), тогда как содержание фукоксантина и диадиноксантина существенно увеличивалось с возрастом культуры. В логарифмической фазе роста концентрация фукоксантина и диадиноксантина составила соответственно 340 и 135 мкг/г, в стационарной фазе она увеличилась соответственно до 912 и 521 мкг/г (рис. 4).

У *P. tricorutum* содержание всех фракций каротиноидов достигало максимального значения на стационарной фазе роста (рис. 4). Содержание β -каротина увеличилось в 16,6 раз: с 8,7 до 144 мкг/г, а фукоксантина - в 2 раза и составило 521 мкг/г по сравнению с логарифмической фазой роста. Концентрация диадиноксантина увеличилась в 1,4 раза (с 72 до 102 мкг/г).

В зеленых водорослях *D. viridis* и *T. suecica* максимальное содержание доминирующей фракции - лютеина отмечено на стационарной фазе роста и составило 630 и 585 мкг/г соответственно, что в 8 - 9 раз выше, чем в

логарифмической фазе роста (рис. 5). Максимальные концентрации β -каротина у *D. viridis* и *T. suecica* были определены в стационарной фазе: 311 и 292 мкг/г, что в 6 раз больше, чем в логарифмической фазе.

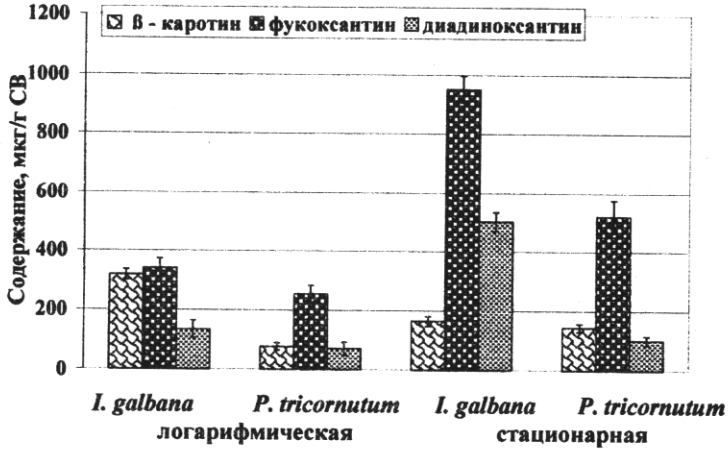


Рис.4 Содержание каротиноидов в микроводорослях *Isochrysis galbana* и *Phaeodactylum tricornerum* на разных фазах роста.

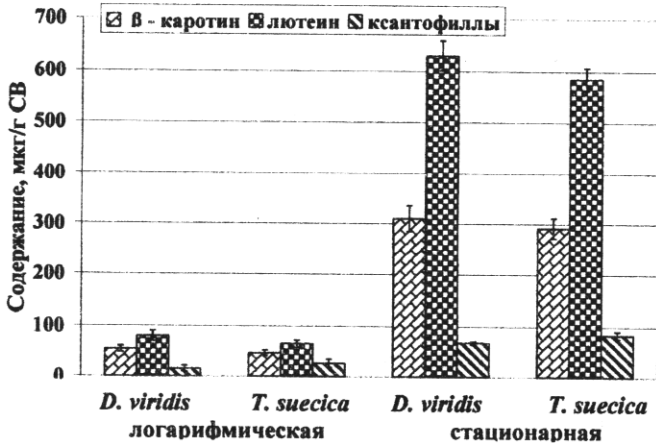


Рис. 5 Содержание каротиноидов в зеленых микроводорослях *Dunaliella viridis* и *Tetraselmis suecica* на разных фазах роста

Известно, что морские животные, в том числе двустворчатые моллюски, не синтезируют каротиноиды *de novo*, поэтому их нахождение в организме

моллюсков является результатом поступления из водорослей (Маока, 2005). Исследования по накоплению каротиноидов личинками и спатом устриц показали, что каротиноидный состав личинок на стадии педивелигера и водорослей, которыми они питались, совпадают. Каротиноиды личинок представлены незначительным количеством неоксантина и ярко выраженными фракциями фукоксантина и β -каротина.

Состав каротиноидов спата устриц отличался от такового в микроводорослях, используемых в качестве их корма. Кроме фракций неоксантина и β -каротина, у спата появляются новые фракции каротиноидов, что вероятно связано с процессом трансформации каротиноидов водорослей.

Элементы управляемого культивирования микроводорослей. Биохимический состав микроводорослей возможно целенаправленно регулировать, изменяя условия их культивирования. Так, от формы азотного питания в среде, на которой выращивали *I. galbana*, зависел уровень содержания белка в водоросли.

Максимальное количество белка, отмечено в логарифмической фазе роста на среде с нитратами или мочевиной, составив соответственно 40,19 и 44,96% (табл. 2).

Таблица 2

Содержание белка и липидов в культуре *I. galbana* на разных стадиях роста при различных условиях азотного питания.

Содержание компонентов сухого вещества, % СВ	Фаза роста	Химическая форма азота		
		Нитраты	Нитриты	Мочевина
Белок	Л	40,19 ± 0,79	37,36 ± 1,23	44,96 ± 0,83
	ЗР	34,50 ± 0,94	34,58 ± 0,96	35,98 ± 1,49
	С	28,01 ± 1,31	33,46 ± 1,41	28,48 ± 1,51
Липиды	Л	21,87 ± 0,47	27,5 ± 3,11	32,33 ± 0,58
	ЗР	34,03 ± 0,50	33,58 ± 0,58	42,05 ± 0,51
	С	38,49 ± 0,51	41,61 ± 0,51	31,96 ± 0,98

Примечание: Л – логарифмическая фаза роста; ЗР – фаза замедления роста; С – стационарная фаза роста

Водоросли, выращенные на мочеvine, содержали больше липидов, чем выращенные на нитратах или нитритах. Максимальное количество липидов отмечено в фазе замедления роста - 42,05%. Следовательно, мочевина может быть использована как форма азотного питания для получения биомассы микроводоросли *I. galbana* «улучшенного» биохимического состава.

Биохимический состав водоросли *I. galbana* изменялся в зависимости от температурного режима культивирования (рис. 6).

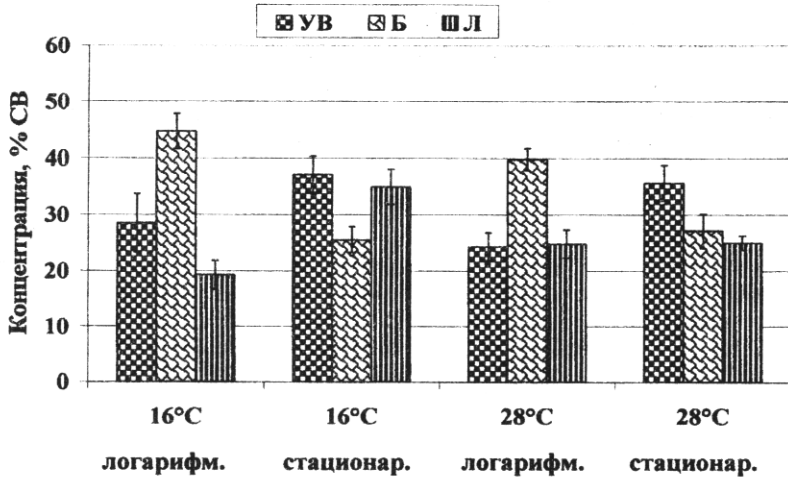


Рис. 6 Влияние температуры на биохимический состав микроводоросли *Isochrysis galbana*: УВ - углеводы, Б - белок, Л - липиды.

Содержание белка у *I. galbana* в логарифмической фазе роста при температуре 16 и 28°C достоверно не различалось и составило соответственно 44,7 и 39,6%. Однако, достоверное различие содержания белка отмечено в зависимости от фазы роста микроводоросли. Так, при 16°C максимальное содержание белка в логарифмической фазе роста составило 44,7%, в стационарной - 28,5%, а при температуре 28°C соответственно 39,8 и 27,1%. Содержание липидов не зависело от фазы роста микроводоросли при температуре 28° С, однако различия были достоверны при температуре 16° С и составляли 19 и 35 % соответственно на логарифмической и стационарной фазах.

МОДИФИКАЦИЯ БИОТЕХНИКИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОВОДОРΟΣЛЕЙ ДЛЯ МАССОВОГО ПРОИЗВОДСТВА КОРМА

Массовое культивирование микроводорослей проводили в двух режимах: накопительном (периодическая культура) и непрерывном (полупроточная культура) (Перт, 1978; Тренкеншу, 2005). Накопительный способ культивирования микроводорослей применялся при выращивании корма для личинок мидий и устриц, находящихся на поздних стадиях развития или при подращивании слата. При выращивании водорослей главной задачей являлось получение за короткий промежуток времени биомассы нужного биохимического состава, поэтому наибольший интерес представляли три фазы роста: логарифмическая, замедления роста и начало стационарной фазы. Ростowymi характеристиками водорослей при накопительном режиме культивирования являлись удельная скорость роста и продуктивность (табл. 3).

Максимальные значения отмечены в логарифмической фазе роста, минимальные - в стационарной.

В логарифмической фазе рост водорослей практически не ограничен минеральными компонентами, поэтому качественный состав водорослей характеризуется максимальным содержанием белка, необходимого личинкам на ранних стадиях развития. В фазе замедления скорость роста водорослей уменьшалась в 1,5 – 2 раза, по сравнению с логарифмической фазой, вследствие снижения концентрации биогенов, а биохимический состав водорослей характеризовался накоплением углеводов.

Таблица 3

Ростовые характеристики микроводорослей на разных фазах развития при массовом культивировании в накопительном режиме

Фаза роста	Удельная скорость роста сут ⁻¹				Продуктивность г · сут ⁻¹			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Логарифмическая	0,43	0,38	0,37	0,18	47,99	113,35	89,67	3,49
Замедления	0,15	0,21	0,17	0,13	29,93	74,50	58,94	2,75
Стационарная	0,01	0,15	0,04	0,04	3,02	13,93	11,02	1,1

Примечание: 1 - *Isochrysis galbana*; 2 - *Tetraselmis suecica*; 3 - *Dunaliella viridis*; 4 - *Chaetoceros calcitrans*

На стационарной фазе роста водорослей прекращается деление клеток, поэтому значения удельной скорости роста и продуктивности минимальны, по сравнению с другими стадиями. В результате отмечалось изменение соотношения их биохимических параметров: в клетках происходило накопление липидов.

Полупроточное культивирование микроводорослей. Полупроточное культивирование характеризуется непрерывным ростом водорослей, который связан с изъятием определенной биомассы и внесением в культуру питательной среды (рис. 7).

Основой управления ростом водорослей при таком культивировании являлось разбавление культуры. Водоросли начинали разбавлять в конце логарифмической фазы роста: на 9-й день - для *T. suecica* и *D. viridis* и 8-й день - для *I. galbana* и *P. tricornutum*.

При скорости протока 0,18 сут⁻¹ (т.е. ежедневном сливе 3 л водорослей) отмечено снижение плотности культур с 9, 87 до 8,35 млн. кл/мл - у *I. galbana*, с 16,52 до 12,9 млн. кл/мл - у *P. tricornutum*, с 2,31 до 1,76 млн.кл/мл - у *T. suecica* и с 2,19 до 1,62 - у *D. viridis* с последующим возвращением за сутки к исходному уровню плотности. При таком режиме культивирования водорослей можно ежедневно изымать до 460 мг сухой биомассы *I. galbana*, 420 мг *P. tricornutum*, 1368 мг *T. suecica* и 1456 мг *D. viridis*, содержащей максимальное количество белка.

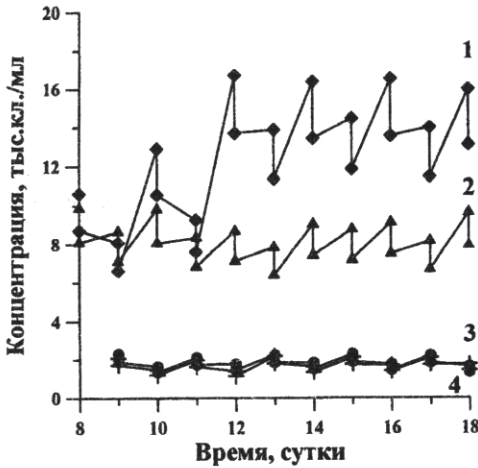


Рис. 7 Изменение концентрации водорослей в полупроточной культуре (скоростью протока 0,18 сут⁻¹):

- 1 - *Phaeodactylum tricornutum*,
- 2 - *Isochrysis galbana*,
- 3 - *Tetraselmis suecica*,
- 4 - *Dunaliella viridis*

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА КОРМА НА РОСТ ЛИЧИНОК УСТРИЦ И МИДИЙ

Оптимальные условия для роста личинок гигантской устрицы. Методом факторного эксперимента, поставленного по схеме латинского квадрата 4x4, определены оптимальные значения концентрации корма, его состава и плотности посадки личинок устрицы и мидии на их рост и выживаемость.

Эксперимент с личинками *S. gigas* проводился в два этапа: 1 - личинки на стадии велигера; 2 - личинки на стадии великонхи. На стадии велигера суммарная концентрация корма была задана в диапазоне 50 - 200 тыс. кл./мл, плотность посадки личинок 5, 10, 15 и 20 тыс. лич./л. В результате математической обработки данных показано, что среднесуточный прирост личинок гигантской устрицы на стадии велигера не зависит от заданной в опыте концентрации корма (Fэксп. = 2,92 < Fтабл. = 4,8) и плотности посадки (Fэксп. = 1,62 < Fтабл. = 4,8). Фактор, значимо влияющий на среднесуточный прирост личинок на стадии велигера, - состав корма (Fэксп. = 5,34 > Fтабл. = 4,8). Путем сравнения максимального и минимального значений с наименьшим значимым рангом показано, что величина среднесуточного прироста личинок достоверно различается при варьировании состава корма.

Максимальный прирост отмечен при использовании корма, состоящего из *I. galbana*, при концентрации 50 тыс. кл./мл (биомасса $1,96 \times 10^6$ мг/л). Примерно такой же прирост личинок - 10,5 мкм/сут. при плотности посадки 20 тыс. лич./л и концентрации *I. galbana* 100 тыс. кл./мл. Следовательно, оптимальные условия для роста велигеров устрицы следующие: состав корма - *I. galbana* в пределах 50 - 100 тыс. кл./мл и плотность посадки от 5 до 20 тыс. лич./л.

В эксперименте с личинками устриц на стадии великонхи суммарная концентрация корма была задана в диапазоне 50 - 200 тыс. кл./мл, плотность

посадки личинок 3, 5, 7 и 9 тыс. лич./л. Концентрация микроводорослей оказалась значимым фактором для роста личинок на стадии великонхи: $F_{\text{эсп.}} = 34,01 > F_{\text{табл.}} = 4,8$ и $F_{\text{эсп.}} = 43,22 > F_{\text{табл.}} = 4,8$ (для числа степеней свободы 3 и 6 и 5% уровня значимости). Максимальный среднесуточный прирост личинок отмечен при концентрации корма 50 тыс. кл/мл и составлял 21,6 мкм/сут., при 100 тыс. кл/мл – 17,7 мкм/сут. Различия всех значений средних статистически достоверны. Коэффициент корреляции прироста и концентрации корма составил: $r = -0,86$ ($P = 0,05$), т.е. наблюдается обратная зависимость темпов роста и концентрации (биомассы) микроводорослей.

Состав корма – значимый фактор, влияющий на рост личинок. Наибольший среднесуточный прирост (22,6 мкм/сут.) отмечен при составе корма *I. galbana* + *C. calcitrans*; затем – при составе корма из трех видов микроводорослей: *I. galbana* + *C. calcitrans* + *T. suecica* (16 мкм/сут.); далее – при *I. galbana* + *T. suecica* (15,5 мкм/сут.) и *C. calcitrans* + *T. suecica* (13,8 мкм/сут.). Между всеми значениями средних величин прироста различия статистически достоверны.

Фактор «плотность посадки» оказался незначимым для среднесуточного прироста личинок, так как не было достоверных различий среднесуточного прироста личинок при плотности посадки от 3 до 9 тыс. лич./л. При сравнении темпа роста личинок в опытах № 2 и № 15 (среднесуточный прирост 21,5 и 21,1 мкм/сут. соответственно), в условиях плотности посадки 3 и 9 тыс. лич./л и одинаковом составе корма (*I. galbana* + *C. calcitrans*) среднее значение биомассы, рассчитанное на 1 тыс. личинок, в опыте № 2 оказалось в два раза выше.

Следовательно, оптимальными условиями для роста личинок устрицы *C. gigas* на стадии великонхи являются: концентрация водорослей в пределах 50 - 150 тыс. кл/мл; корм, состоящий из *I. galbana* + *C. calcitrans* в соотношении клеток 1:1; плотность посадки личинок в пределах 3-9 тыс. лич./л.

По результатам ПФЭ 2^2 получено уравнение зависимости среднесуточного прироста личинок на стадии велигера (1) и великонхи (2) от плотности посадки личинок и концентрации корма:

$$\Delta Y_{1,2} = 2,98 + 0,62 \cdot X_2 + 0,27 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad - (1)$$

$$\Delta Y_{1,2} = 18,86 + 4,37 \cdot X_1 \quad - (2)$$

Установлено, что на уровень выживаемости личинок на стадии велигера ни один из факторов не оказал существенного влияния:

$$\Delta Y_{1,2} = 82,77.$$

Уравнение регрессии выживаемости личинок, проходящих поздние стадии развития, имело следующий вид:

$$\Delta Y_{1,2} = 80,72 - 2,70 \cdot X_1 + 7,82 \cdot X_2$$

Концентрация водорослей является определяющим фактором, влияющим на выживаемость личинок на стадиях великонхи и педивелигера. Его влияние в 2,8 раза превышало влияние фактора плотности посадки личинок. Из уравнения следует, что выживаемость личинок максимальна при низкой плотности посадки и высоком уровне концентрации корма. Если концентрация корма составляла 70 тыс. кл/мл, а плотность – 3 тыс. лич./л, то выживаемость была максимальной.

Оптимальные условия для роста личинок мидии *M. galloprovincialis*.

На стадии велигера плотность посадки личинок изменяли от 10 до 40 тыс. лич./л, концентрацию корма от 5 до 40 тыс. кл./мл. В результате математической обработки данных показано, что плотность посадки личинок ($F_{\text{эксп.}} = 45,1 > F_{\text{табл.}} = 4,8$) и суммарная концентрация корма ($F_{\text{эксп.}} = 18,4 > F_{\text{табл.}} = 4,8$) являются значимыми факторами для роста. Среднесуточный прирост личинок в равной степени зависел как от биомассы водорослей, так и от плотности посадки личинок. Максимальный среднесуточный прирост личинок (4 мкм/сут.) наблюдался при плотности посадки 10 тыс. лич./л и корме из двух видов водорослей (*I. galbana* и *M. lutheri*) в суммарной концентрации 40 тыс. кл./мл.

В эксперименте с личинками мидий на стадии великонхи и педивелигера суммарная концентрация корма была задана в пределах от 10 до 70 тыс. кл./мл, а плотность посадки от 5 до 30 тыс. лич./л. Концентрация корма и плотность посадки личинок на поздних стадиях также оказались значимыми факторами для роста ($F_{\text{эксп.}} = 39,31 > F_{\text{табл.}} = 4,8$; $F_{\text{эксп.}} = 22,27 > F_{\text{табл.}} = 4,8$). Максимальный среднесуточный прирост личинок (10,7 - 12,2 мкм/сут.) получен при плотности посадки 5 тыс. лич./л и концентрации корма 70 тыс. кл./мл, при составе корма из трех видов водорослей - *I. galbana*, *M. lutheri* и *P. tricornutum*. Однако среднесуточный прирост при концентрации корма 70 и 50 тыс. кл./мл достоверно не отличался. Следовательно, суммарная концентрация 50 тыс. кл./мл является оптимальной при культивировании личинок мидий на поздних стадиях развития.

Выживаемость личинок на стадии велигера зависела от плотности посадки личинок. При минимальной плотности посадки (10 тыс. лич./л) выживаемость имела максимальное значение.

Выживаемость личинок на стадии великонха и педивелигера не зависела от их плотности посадки и концентрации корма ($F_{\text{эксп.}} = 0,34 < F_{\text{табл.}} = 4,8$; $F_{\text{эксп.}} = 0,16 < F_{\text{табл.}} = 4,8$ по критерию Фишера для 5%-ного уровня значимости и числа степеней свободы 3 и 6). Однако наблюдалась тенденция увеличения прироста личинок при составе микроводорослей из *I. galbana* + *M. lutheri* + *P. tricornutum*.

Таким образом, оптимальными условиями культивирования личинок мидий на стадии велигера являются плотность посадки 10 тыс. лич./л при суммарной концентрации корма 40 тыс. кл./мл из смеси водорослей *I. galbana* + *M. lutheri*. На стадии великонхи и педивелигера плотность посадки 5 тыс. лич./л и концентрация корма 50 тыс. кл./мл из смеси водорослей *I. galbana* + *M. lutheri* + *P. tricornutum* в соотношении 1:1:1.

ПОТРЕБЛЕНИЕ И УСВОЕНИЕ КОРМА ЛИЧИНКАМИ МИДИЙ И УСТРИЦ

Потребление микроводорослей личинками устрицы *S. gigas*. Скорость потребления микроводорослей личинками устриц и мидий определяли по уменьшению концентрации фитопланктона за время опыта. Отмечено, что на стадии велигера среднесуточный прирост личинок устриц составил 8,32 мкм при потреблении *I. galbana* до 6310 кл./лич·сут. Коэффициент корреляции среднесуточного прироста велигеров и концентрации (биомассы) потребленных

микроводорослей имел максимальное значение - 0,99.

Рацион личинок устриц на стадии великонхи состоял из трех видов микроводорослей: *I. galbana*, *D. viridis* и *P. tricornutum* при концентрации 350 тыс. кл/мл. Результаты эксперимента показали, что потребление личинками разных видов водорослей было неодинаково: 50% составил *I. galbana*, 35% - *P. tricornutum* и 15% - *D. viridis*, что указывает на избирательность питания. Суммарное потребление микроводорослей одной личинкой *C. gigas* за сутки увеличилось до 26 тыс. кл, по сравнению с предыдущей стадией. При этом среднесуточный прирост личинок составил 18,17 мкм, что в 2,2 раза выше, чем на стадии велигера. Значение коэффициента корреляции среднесуточного прироста личинок и концентрации потребляемого корма составило 0,88, а среднесуточного прироста и биомассы микроводорослей - 0,58.

Потребление микроводорослей личинками мидий. На стадии велигера среднесуточный прирост личинок мидий в опыте составил 4,5 мкм/сут при потреблении *I. galbana* до 2170 кл/лич. сут. Потребление водорослей личинками на стадии великонхи увеличилось до 15 тыс. кл/лич.: 52% - *I. galbana*, 22% - *P. tricornutum* и 26% - *D. viridis*, при этом прирост личинок составил 7,82 мкм/сут.

Установлено различие потребности в микроводорослях личинок мидий и устриц, проходящих аналогичные стадии развития (табл. 4). Суточный рацион личинок устриц на стадиях велигера и великонхи выше соответственно в 3 и 2 раза, чем личинок мидий.

Таблица 4

Потребление микроводорослей и среднесуточный прирост личинок устриц и мидий

Стадия личинок	Личинки устриц		Личинки мидий	
	Потребление водорослей, кл./лич.сут	Среднесуточный прирост, мкм/сут.	Потребление водорослей, кл./лич.сут	Среднесуточный прирост, мкм/сут
Велигер	6310	8,32	2170	4,5
Великонха	26000	18,17	15000	7,82

Пищевые рационы для личинок устриц. На основе полученных данных по биохимическому составу кормовых видов водорослей и результатов факторного эксперимента по оптимизации биотехники культивирования личинок впервые составлены пищевые рационы для личинок устриц и мидий для каждой стадии развития. При составлении рационов учитывали также морфологические особенности водорослей и их калорийность (табл. 5).

На стадии велигера пищевой рацион личинок устриц состоит из монокультуры *I. galbana* концентрации 50 тыс. кл/мл.

На стадии великонхи смесь микроводорослей *I. galbana* + *C. calcitrans*, является оптимальной для роста и выживаемости личинок устриц. Темп роста и выживаемость личинок на монодиете *I. galbana* или *C. calcitrans* были значительно ниже, чем на смешанной диете. Питательная ценность

микроводорослей *I. galbana* и *C. calcitrans* обусловлена высоким содержанием белка, липидов, углеводов и полиненасыщенных жирных кислот. Высокий индекс пищевой ценности микроводоросли *I. galbana* определяется повышенным содержанием белка (49,8%). Личинки на ранних стадиях развития, питающиеся водорослями с высоким содержанием белка, имели высокие значения темпа роста и выживаемости.

Таблица 5

Калорийность кормовых видов микроводорослей (ккал/г СВ)

Вид водорослей	Белок, ккал/г СВ	Липиды, ккал/г СВ	Углеводы, ккал/г СВ	Суммарная калорийность, ккал/г СВ
<i>Isochrysis galbana</i>	2,19	2,38	1,67	6,24
<i>Monochrysis lutheri</i>	1,91	2,51	0,82	5,24
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	1,28	2,51	1,77	5,56
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	1,67	1,86	1,24	4,77
<i>Tetraselmis suecica</i>	1,25	1,94	0,98	4,17
<i>Dunaliella viridis</i>	1,52	1,67	0,84	4,03

После трех недель выращивания личинок устриц (стадия педивелигера), когда их размер составлял 350 мкм, в состав корма вводили микроводоросль *T. suecica*. Размер клеток и биохимический состав водоросли соответствовали потребностям личинок. *T. suecica* содержит 30,4% белка и 20,9% липидов. При добавлении к смеси *I. galbana* + *C. calcitrans* микроводоросли *T. suecica* среднесуточный прирост личинок увеличивался с 4,5 до 5,7 мкм/сут. и личинки успешно проходили метаморфоз. На стадии педивелигера необходимо использовать в качестве добавки к основному корму микроводоросль *D. viridis*, поскольку, она содержит большое количество каротиноидов.

Пищевые рационы для личинок мидий. Пищевой рацион личинок мидий, в отличие от устриц, на стадии велигера состоял из смеси микроводорослей *I. galbana* и *M. lutheri* в концентрации 40 тыс. кл/мл и соотношении клеток 1:1. Клетки *M. lutheri* имеют округлую форму и небольшие размеры (13,85 мкм³), поэтому легко заглатываются личинками и хорошо усваиваются. Водоросль богата белком, липидами, доля ВНЖК в липидах составляет 34%, а содержание витаминов В₆ и С соответственно 162 мг г⁻¹ и 837 мг г⁻¹ (Dunstan, 1994; Perez-Camacho, 1998).

Для личинок мидий на стадии великонхи и педивелигера оптимальной для роста является смешанная диета, состоящая из водорослей *I. galbana*, *M. lutheri* и *P. tricornutum* в соотношении клеток 1:1:1, концентрации 50 – 100 тыс.кл/мл. Добавление в корм микроводоросли *P. tricornutum*, способствовало увеличению среднесуточного прироста личинок на стадии великонхи в 2 раза. Клетки *P. tricornutum* имеют плотную целлюлозную оболочку и

перевариваются личинками за 4–5 ч. Водоросль богата белком (40,7%), липидами (20%) и содержанием ВНЖК до 25%.

Усвоение корма личинками устриц и мидий. Установлено, что личинки устриц и мидий начинают питаться соответственно на 2 и 4-й день. К этому времени у них уже развита пищеварительная система. Из трех предложенных видов водорослей *I. galbana*, *D. viridis* и *P. tricorutum* - в первые два дня выращивания личинки не заглатывали водоросли, даже если их количество было избыточным. Вероятно, в это время энергию для дыхания и развития личинки получают за счет питательных веществ яйцеклетки. Размер яйцеклеток мидий и устриц составляет 80 и 55 мкм и, следовательно, запас питательных веществ у мидий больше чем у устриц, поэтому личинки мидий могут находиться на эндогенном питании до 4 дней.

На третий день выращивания личинки заглатывали только *I. galbana*, все другие виды водорослей не употреблялись ими, а если и поступали в пищеварительную систему, то не переваривались, что связано со строением пищеварительной системы моллюсков. Поэтому на стадии раннего велигера размер клеток водорослей является главным фактором в отборе пищи личинками.

Продолжительность переваривания микроводорослей личинками устриц зависит от их возраста. Личинки устриц в возрасте 3–4-х дней переваривали клетки микроводоросли *I. galbana* за 8–10 ч, с 5 по 6-й день – за 4 ч, на 7–8-й день личинки полностью переваривают водоросли в течение 2–3 ч.

Индекс усвоения водорослей, определяемый как степень усвоения в течение 2 ч, увеличивался с возрастом и размером личинок. На стадии велигера индекс усвоения личинками был самым высоким у *I. galbana* (8,4%), и никакого усвоения не установлено для *D. viridis* и *P. tricorutum*.

Следовательно, на стадии велигера основным кормом для личинок устриц является золотистая водоросль *I. galbana*. Клетки этих водорослей имеют небольшие размеры – 5–6 мкм (средний объем 39,19 мкм³) и тонкую целлюлозную оболочку, что делает их доступными для усвоения личинками. Микроводоросли *D. viridis* и *P. tricorutum* являются неподходящим кормом для личинок устрицы на стадии велигера. Личинки не способны переварить клетки *D. viridis* из-за их больших размеров (средний объем 313,5 мкм³), а *P. tricorutum* из-за плотной клеточной оболочки.

Продолжительность переваривания личинками на стадии великонхи (12–14 сутки выращивания) клеток четырех видов водорослей была различной: *I. galbana* за 1 ч, *D. viridis* и *T. suecica* – за 3 ч, *P. tricorutum* – за 4 ч, что связано с морфологическими особенностями этих водорослей.

ВЫВОДЫ

1. Биотехника культивирования личинок двустворчатых моллюсков в питомнике базируется на оптимизации условий выращивания микроводорослей для их трофических потребностей.
2. Рацион питания личинок гигантской устрицы *Crassostrea gigas* и мидии *Mytilus galloprovincialis* в условиях выращивания на Черном море может

быть обеспечен шестью видами микроводорослей: *Isochrysis galbana*, *Monochrysis lutheri*, *Dunaliella viridis*, *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros calcitrans*, *Phaeodactylum tricornerutum*.

3. Оптимальными условиями культивирования микроводорослей в накопительном и проточном режимах являются: температура 22 - 24°C, интенсивность света 172 мкЕ м⁻² с⁻¹, круглосуточная аэрация газовой смеси (воздух + 2% углекислого газа) и морская вода, обогащенная питательной средой Конвея.

4. Максимальная биомасса каждого вида микроводорослей, содержащих до 27% липидов, достигается при накопительном режиме культивирования. Водоросли с высоким содержанием белка (до 48,9%) и стабильной биомассой можно получить при полупроточном культивировании.

5. Накопление белка, углеводов и липидов в микроводорослях зависит от их фазы роста: в логарифмической фазе накапливается белок, в фазе замедления роста – углеводы, в стационарной фазе – липиды.

6. Каротиноиды микроводорослей *Isochrysis galbana*, *Dunaliella viridis*, *Tetraselmis suecica* и *Phaeodactylum tricornerutum* представлены шестью фракциями. Их максимальное накопление происходит в стационарной фазе роста. Личинки устриц накапливают каротиноиды микроводорослей без изменения, у спата отмечена трансформация фракций каротиноидов.

7. Биохимический состав микроводорослей зависит от формы азотного питания и температурных условий выращивания. Максимальное количество белка водоросли накапливали в логарифмической фазе роста на среде с нитратами или мочевиной. Самое высокое содержание липидов отмечено в стационарной фазе роста при низкой температуре (16° С) на среде с мочевиной.

8. Концентрация микроводорослей является определяющим фактором роста личинок мидии *Mytilus galloprovincialis* и устрицы *Crassostrea gigas* на стадии велигера, а выживаемости - на стадиях великонхи и педивелигера.

9. Оптимальными условиями для роста личинок устриц на стадии велигера являются: микроводоросль *I. galbana* - концентрация 50 - 100 тыс. кл./мл, плотность посадки личинок в пределах 5-20 тыс. лич./л. Для личинок на стадии великонхи - смесь микроводорослей *I. galbana*+ *C. calcitrans* при концентрации корма 50-150 тыс.кл./мл и плотности посадки личинок от 3 до 9 тыс. лич./л; для личинок на стадии педивелигера - *I. galbana* + *C. calcitrans* + *T. suecica* (150-200 тыс. кл./мл).

10. Оптимальными условиями культивирования личинок мидий на стадии велигера являются плотность посадки 10 тыс. лич./л при суммарной концентрации корма 40 тыс. кл./мл, состоящем из смеси водорослей *I. galbana* + *M. lutheri*. На стадии великонхи и педивелигера - плотность посадки 5 тыс. лич./л и концентрации корма 50-100 тыс. кл./мл, из смеси водорослей *I. galbana*+ *M. lutheri*+*P. tricornerutum* .

11. Установлены количественные различия суточного потребления микроводорослей личинками устриц и мидий и избирательность их питания.

Потребление микроводорослей велигерами устриц в 3 раза, а великонхами в 2 раза выше, чем личинками мидий на аналогичных стадиях различия.

12. Полученные результаты могут быть рекомендованы для промышленного получения кормов при выращивании личинок и спата устриц и мидий в питомнике, а также при организации полноциклических марихозяйств моллюсков.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Пиркова А.В., Холодов В.И., Ладыгина Л.В. Оптимизация некоторых элементов культивирования личинок мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Гидробиол. журн. – 1998. – Т. 34, №1. – С. 57-61.
2. Пиркова А.В., Ладыгина Л.В. Рост и выживаемость личинок мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. полученных при разных типах скрепления и самооплодотворения // Гидробиол. журн. – 2002. – 38. – №4. – С. 30-35
3. Ладыгина Л.В., Пиркова А.В. Оптимизация биотехники культивирования личинок гигантской устрицы *Crassostrea gigas* (Th.) в питомнике // Экология моря. – 2002. – Вып. 60. – С. 60-64.
4. Холодов В.И., Пиркова А.В., Ладыгина Л.В. Акклиматизация тихоокеанской устрицы *Crassostrea gigas* (Th.) в Черном море // Рыбн. хоз-во Украины. – 2003. – № 2. – С. 6-8.
5. Холодов В.И. Пиркова А.В., Ладыгина Л.В. Теоретические и экспериментальные аспекты оптимального управления в аквакультуре // Рыбн. хоз-во Украины. – 2003. – № 6. – С. 40-43.
6. Пиркова А.В., Ладыгина Л.В. Определение оптимальных условий роста и выживаемости личинок устрицы *Crassostrea gigas* (Th) на разных стадиях развития // Рыбн. хоз-во Украины. – 2004. – № 6. – С. 174-177.
7. Ладыгина Л.В. Элементы управляемого культивирования микроводоросли *Isochrysis galbana* – корма для личинок устриц // Рыбн. хоз-во Украины. – 2005. – № 1(36). – С. 23-25.
8. Ладыгина Л.В. Биохимическая характеристика микроводорослей – кормовых объектов двустворчатых моллюсков // Рыбн. хоз-во Украины. – 2005. – №7. – С. 97-100.
9. Ладыгина Л.В. Интенсивность роста и биохимический состав микроводоросли *Dunaliella viridis* Teod. в зависимости от условий культивирования // Экология моря. – 2005. – Вып. 67. – С. 56-60.
10. Ладыгина Л. В. Культивирование микроводорослей в питомнике – корма для производителей и личинок устриц // Вісн. Житомир. пед. ун-ту. – 2002. – Вип. 10. – С. 70 – 71.
11. Ладыгина Л.В., Пиркова А.В. Потребление микроводорослей личинками устрицы *Crassostrea gigas* (Th.) // Еколого-функціональні та фауністичні аспекти дослідження молюсків і їх роль у біоіндикації стану навколишнього середовища. — Житомир: Вид-во ЖДУ, 2006. – Вип 2. – С. 170-173.
12. Ладыгина Л.В. Динамика популяций культивируемых видов микроводорослей в зависимости от углеродного питания // Современные

проблемы популяционной экологии: Тез. докл. междунар. конф., Белгород, 2-5 окт. 2006. - Белгород: Изд-во Политехна, 2006. - С. 109-110.

13. Пат. № 76680 Ua, МКИА.01К61/00 Спосіб вирощування гігантської устриці *Crassostrea gigas* у Чорному морю / А.В. Піркова, Л.В. Ладигіна. - № 200507328; Заявлено 22.07.05. Опубл. 15.11.05. Бюл. № 11.

14. Заявка № 2006 13362 Способ подготовки кормов для выращивания гигантской устрицы *Crassostrea gigas* в условиях питомника / Л.В. Ладыгина. - Заявлено 18.12.2006

АННОТАЦИЯ

Ладыгина Л.В. – Микроводоросли как кормовые объекты личинок мидий и устриц – Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.17 – гидробиология. - Институт биологии южных морей НАН Украины, Севастополь, 2007.

Исследованы закономерности роста микроводорослей (*Isochrysis galbana*, *Monochrysis lutheri*, *Dunaliella viridis*, *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros calcitrans*, *Phaeodactylum tricornerutum*) в накопительном и полупроточном режимах культивирования в зависимости от условий выращивания. Показано, что оптимальными условиями культивирования водорослей являются: температура 22-24°C, интенсивность света 172 мкЕ м⁻² с⁻¹, круглосуточная аэрация газовой смесью (воздух + 2% углекислого газа) и морская вода, обогащенная питательной средой Конвея.

Определен биохимический состав микроводорослей, использованных в качестве корма для личинок устрицы *Crassostrea gigas* (Th) и мидии *Mytilus galloprovincialis* (Lam.). Показано, что накопление белка, углеводов, липидов в микроводорослях зависит от фазы роста: в логарифмической фазе накапливается белок, в фазе замедления роста – углеводы, в стационарной фазе – липиды. Впервые исследован количественный и качественный состав каротиноидов кормовых видов водорослей. Максимальное содержание каротиноидов отмечено в стационарной фазе роста. Личинки устриц накапливают каротиноиды микроводорослей без изменения, у спата происходит трансформация фракций каротиноидов.

Впервые выявлены трофические потребности личинок устриц и мидий, выращиваемых в питомнике, и составлены пищевые рационы для каждой стадии их развития. Отмечено, что потребление микроводорослей велигерами устриц в 3 раза, а великонхами в 2 раза выше, чем личинками мидий на аналогичных стадиях развития. Определены оптимальные условия роста личинок устриц и мидий в зависимости от количества корма, его состава и плотности посадки личинок. Установлено, что среднесуточный прирост личинок гигантской устрицы на стадии велигера зависит от состава корма, а на стадии великонхи - от концентрации и состава корма. На рост личинок мидий на стадии велигера и великонхи влияет плотность посадки и концентрация корма. Результаты исследований легли в основу разработки биотехники

выращивания личинок моллюсков в контролируемых условиях и внедрены в действующий питомник ИнБЮМ НАН Украины.

Ключевые слова. Микроводоросли, личинки, устрица *Crassostrea gigas*, мидия *Mytilus galloprovincialis*, биохимический состав, белок, углеводы, липиды, каротиноиды, питомник.

АНОТАЦІЯ

Ладигіна Л.В. – Микроводорості як кормові об'єкти личинок мідій і устриць – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.17 – гідробіологія. - Інститут біології південних морів НАН України, Севастополь, 2007.

Досліджені закономірності росту микроводоростей (*Isochrysis galbana*, *Monochrysis lutheri*, *Dunaliella viridis*, *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros calcitrans*, *Phaeodactylum tricornerutum*) при накопичувальному і напівпроточному режимах культивування в залежності від умов вирощування. Показано, що оптимальними умовами для культивування водоростей є: температура 22-24°C, інтенсивність світла 172 мкЕ м⁻²с⁻¹, цілодобова аерація газоповітряною сумішшю (повітря + 2% вуглекислого газу) і морська вода, збагачена живильним середовищем Конвея.

Визначений біохімічний склад микроводоростей, використаних як корм для личинок устриці *Crassostrea gigas* (Th.) і мідії *Mytilus galloprovincialis* (Lam.). Показано, що накопичення білка, вуглеводів, ліпідів в микроводоростях залежить від фази росту: в логарифмічній фазі накопичується білок, у фазі уповільнення зростання – вуглеводи, в стаціонарній фазі – ліпіди. Вперше досліджений кількісний і якісний склад каротиноїдів кормових видів водоростей. Максимальний вміст каротиноїдів відзначено в стаціонарній фазі росту. Личинки устриць накопичують каротиноїди микроводоростей без зміни, а у спаті відбувається трансформація фракцій каротиноїдів.

Вперше виявлені трофічні потреби личинок устриць і мідій, вирощуваних у розпліднику, і складені харчові раціони для кожної стадії їх розвитку. Визначено, що споживання микроводоростей велігерами устриць в 3 рази, а веліконхами - в 2 рази вище, ніж личинками мідій на аналогічних стадіях розвитку. Визначені оптимальні умови росту личинок устриць і мідій, залежно від кількості корму, його складу і щільності посадки. Встановлено, що середньодобовий приріст личинок велетенської устриці на стадії велігера залежить від складу корму, а на стадії веліконхи - від концентрації і складу корму. На ріст личинок мідій на стадії велігера і веліконхи впливає щільність посадки і концентрація корму. Результати досліджень стали основою розробки біотехніки вирощування личинок моллюсків в контрольованих умовах і впроваджені в діючий розплідник ІнБПМ НАН України.

Ключові слова: микроводорості, личинки, устрица *Crassostrea gigas* (Th.), мідія *Mytilus galloprovincialis* (Lam.), біохімічний склад, білок, вуглеводи, ліпіди, каротиноїди, розплідник.

SYNOPSIS

Ladygina L.V. – Microalgae as a food item for larvae of mussels and oysters – Manuscript.

Thesis for Master's Degree in biology, the field of specialization: 03.00.17 – hydrobiology. – Institute of Biology of the Southern Seas, National Academy of Sciences of Ukraine, Sevastopol, 2007.

The study focused on growth regularities characteristic of continuous and semi-flow-through cultures of microalgae (*Isochrysis galbana*, *Monochrysis lutheri*, *Dunaliella viridis*, *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros calcitrans*, *Phaeodactylum tricorutum*) depended upon culture conditions. It was found that optimum culture conditions were the temperature of 22-24° C, the light of 172 mcE m⁻² sec⁻¹, twenty-four-hour aeration (air + 2% carbon dioxide) and the sea water enriched with Conway nutritional medium.

The investigation has specified the biochemical fractions of microalgae used to feed larvae of the oyster *Crassostrea gigas* (Th) and the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lam.). Results obtained point out that protein, carbohydrate and lipid accumulation in the larvae depends upon the growth stage: proteins are accumulated during log-phase, carbohydrates – during inhibited growth and lipids – during steady-state phase. For the first time the quantitative and qualitative composition of carotenoids was studied in the forage microalgae. Carotenoid content was highest during the steady-state growth phase. In larvae of the oyster microalgal carotenoids accumulated unchanged, while in the growing spat carotenoid fractions underwent transformation.

For the first time food requirement of cultured larvae of the oysters and mussels and the rations special to each developmental stage were specified. The study has shown that the rate of microalgal grazing by veligers and by veliconchs of the oyster is correspondingly 3 and 2 times as large as that by identical stages of the mussel larvae. Optimum growth conditions were determined in relation to the amount and composition of the forage and the stocking density of cultured larvae. It was found that in the veligers and veliconchs of *Crassostrea gigas* average daily increment depended upon the diet and upon the diet and microalgal concentration, respectively. In the veligers and veliconchs of *Mytilus galloprovincialis* the determining factors were the stocking rate and the forage concentration, respectively. The results obtained underlie the biotechnology for controlled rearing of mollusc larvae that has been put into practice at the rearing station of the Institute of Biology of the Southern Seas, National Academy of Sciences of Ukraine.

Key words. Microalgae, larvae, oyster *Crassostrea gigas*, mussel *Mytilus galloprovincialis*, biochemical composition, proteins, carbohydrates, lipids, carotenoids, hatcher.