

## ОПЫТ МАССОВОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ИНФУЗОРИЙ В МОРСКОЙ ВОДЕ

Н. В. Новоселова

Южный научно-исследовательский институт морского рыбного хозяйства и океанографии (ЮгНИРО)

*В работе приводятся данные по культивированию инфузорий в морской воде. Кормом для инфузорий служили питательные среды на основе органического удобрения с добавлением полисахаридов, аминокислот, витаминов и азотных солей. Материал представлен в виде графических рисунков.*

Ключевые слова: инфузории, культивирование, питательная среда, плотность

*Experience of the ciliate mass culture in the sea water. N.V. Novoselova. The data on the ciliate culture in the sea water are given. The ciliate was fed on nutrient media on the basis of the organic fertilizer with addition of polysaccharides, amino acids, vitamins, nitric salts. The material is presented in the form of graphic figures.*

Keywords: ciliate, culture, nutrient medium, density

### Введение

Инфузории – это простейшие организмы (тип *Protozoa*), тело которых морфологически соответствует одной клетке, будучи вместе с тем самостоятельным организмом со всеми присущими организму функциями. Свободноживущие инфузории играют заметную роль в пищевых цепях водоемов, активно питаются бактериями и микроводорослями, и сами являются пищей для многих беспозвоночных организмов. В самый начальный период перехода на активное питание личинки пресноводных рыб нуждаются в мелких, так называемых стартовых кормах, размером от 40 до 200 мкм. Инфузории из-за своих небольших размеров (20-300 мкм), малой подвижности, способности образовывать громадные плотности численности (более 100 тыс. экз./л), удобной для заглатывания рыбами формой тела, служат прекрасным стартовым кормом [11].

В настоящее время существуют методы промышленного разведения пресноводных инфузорий. Простейших выращивают следующими методами: периодическое культивирование или полунепрерывное, и накопительное. Основным видом инфузорий, выращиваемых в пресноводной аквакультуре, являются инфузории рода *Paramecium*. Кроме того, инфузории как животные организмы обладают высокими кормовыми достоинствами. Это высокобелковый, легко усвояемый корм. В сухом веществе парамеций содержится: протеина – 58,1; жира – 11,8-19,9; углеводов – 4; золы – 3,4 %. Полноценен и аминокислотный состав белков: присутствует полный набор незаменимых кислот, например, содержится: лизина – 4,7 %, метионина – 1,2 % [7-9, 11, 16, 23]. Применение этих способов выращивания инфузорий обеспечивает непрерывный рост и довольно высокую продуктивность культуры (до 500 мг/м<sup>3</sup> сырой биомассы ежедневно).

Личинкам морских рыб, в отличие от пресноводных, требуются совсем мелкие стартовые корма от 20 до 40 мкм. [4, 12, 13, 20]. Попытки промышленного способа выращивания морских простейших начались за рубежом с 70-х гг. XX века. Культивируемыми видами являлись ресничные инфузории: р. *Euplotes*, р. *Favella*, р. *Tintinnopsis*, р. *Fabres* [20].

В 1980-е гг. появляются работы о применении инфузорий как стартового корма для личинок морских рыб, обусловленные их высокой воспроизводительной способностью [8, 12-14, 17]. В рыбководстве давно известно, что концентрация живого корма ясно определяет степень его доступности. Исследователи к середине 1980-х гг. выяснили, что морские инфузории могут давать при культивировании очень большие плотности, поэтому вследствие своих малых размеров и малой подвижности они являются самым доступным кормом для самых мелких личинок морских рыб [15]. В 1990-е гг. проводятся исследования по оценке питательных качеств морских

инфузорий как корма для личинок рыб. Вследствие своей способности к поглощению различных химических и биологических веществ не только ртом, но и всей поверхностью тела, питательную ценность инфузорий можно легко изменять, применяя при выращивании различные ингредиенты. Состав пищи, в свою очередь, влияет на время генерации инфузорий [4].

Способы и методы содержания и выращивания морских инфузорий опираются на микробиологические методические разработки по культивированию простейших [2, 14, 19-23]. При различных методах выращивания инфузорий (полунепрерывный, периодический, накопительный) выделяют три фазы культивирования простейших:

1. лаг-фаза (культура находится в состоянии накопления биоресурсов для размножения), время адаптации к условиям культивирования;
2. фаза ускоренного роста, или фаза экспоненциального роста;
3. фаза замедленного роста;
4. стационарная фаза или «плато», замедление и прекращение фазы роста культуры.

В практике разведения инфузорий используют для их кормления сеной настоей, кормовые и пекарские дрожжи, микроводоросли и различные питательные добавки в виде солей химических веществ, полисахариды, аминокислоты, витамины. При выращивании инфузорий необходимо учитывать такие параметры среды: содержание кислорода, оптимум – 4-8 мг/л; водородный показатель pH – 7,6-8,5; температура – 20-28 °С; продукты метаболизма следует удалять; регулировать количество и качество корма [1, 9, 11]. Несмотря на определенные успехи в области культивирования морских инфузорий, к настоящему времени еще не существует способов их промышленного воспроизводства. В своей работе мы попытались обобщить опыт культивирования инфузорий в морской воде.

### Материал и методика

Мы провели массовое культивирование следующих видов инфузорий: *Euplotes affinis*, *E. charon*, *Mesodinium pulex*, *Metacylis mediterranea* var. *longa*. Выращивание проходило в различных пластиковых емкостях. Объем культуральной среды составлял 900-2000 л. В период проведения массового выращивания основные гидрохимические параметры среды оставались на одном уровне и варьировали соответственно: содержание кислорода – 4,8-7,5 мг/л; водородный показатель – 8,1-8,4; соленость – 12-20 ‰. Работы проходили на фоне природного колебания температуры от 16 до 25 °С.

В качестве корма для инфузорий применяли питательные среды и кормовые дрожжи *Torulopsis utilis*, «торулла». Питательные среды готовили следующим образом, на 1 м<sup>3</sup> морской воды вносили: среда № 1 – коровий навоз, 1 кг; кормовой витамин В12 – 10-15 мг; азотнокислый натрий – 5-10 г; картофельный крахмал – 5-10 г; глюкоза – 10-20 мг; кормовые дрожжи – 20-30 мг; метионин – 10-20 мг. Настаивали 5-10 суток и вносили ежедневно по 1-2 л/м<sup>3</sup>. Питательная среда № 2 содержала такие же ингредиенты, кроме глюкозы. Применение питательных сред начинали за 10-20 суток до внесения маточной культуры. Также использовали различные ракушечные фракции на дно бассейнов в качестве подстилающего и фильтрующего слоя в количестве 4-10 кг/м<sup>2</sup>.

Следует оговорить особенности массового культивирования вышеперечисленных видов инфузорий. Предварительное культивирование инфузорий в аквариумах объемом до 50 л показало, что оба вида инфузорий р. *Euplotes* встречаются в совместной культуре, но в период выращивания вид *E. affinis* подавляет вид *E. charon*, причем оба вида не образуют численность больше чем 20-40 экз./мл. Эти виды, как правило, появляются в культурах коловратки *Brachionus plicatilis*, то есть всегда присутствуют в месте обитания коловраток. Но при совместном культивировании с коловраткой в небольших емкостях обычно ее вытесняют. Инфузории *Mesodinium pulex* и *Metacylis mediterranea* редко встречаются с другими видами. Вид *M. mediterranea* совсем «не поддается» культивированию с другими видами инфузорий. Поэтому совместное выращивание всех перечисленных видов нежелательно. Учитывая эти особенности, мы проводили индивидуальное выращивание каждого вида. Полученные нами данные приводятся в виде графических рисунков.

На всех рисунках мы представляем усредненные результаты проводимых исследований, полученные на экспериментальной базе НИБ «Заветное» за период с 1985 по 2008 г. Длительность

культивирования составляла 30-45 суток. Каждые 2-3 суток проводили изъятие 1/3 части продукции в виде сырой биомассы. Мы приводим период культивирования, за который можно получить максимальную численность определенного вида (6-13 суток).

### Результаты исследований и их обсуждение

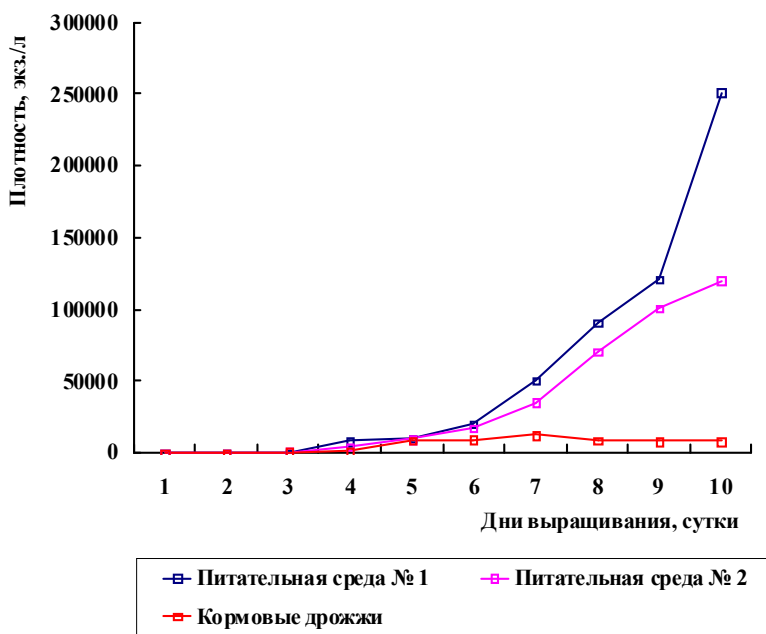


Рисунок 1. Изменение плотности инфузории *E. affinis* в зависимости от состава вносимого корма, объем культуральной среды – 1000 л

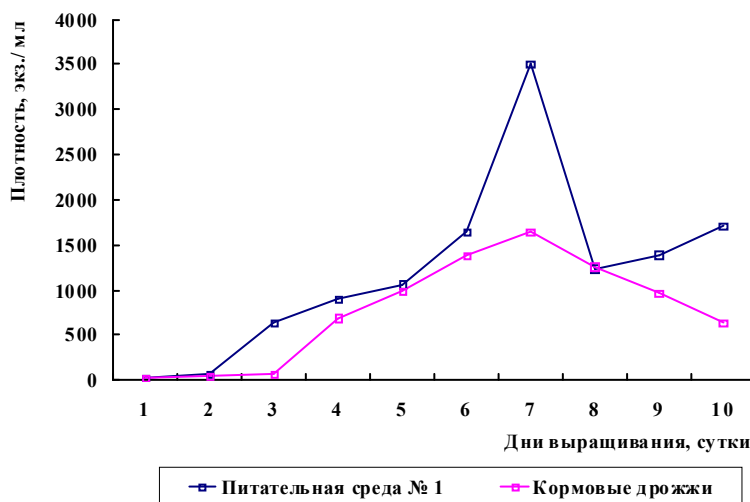


Рисунок 2. Изменение плотности инфузории *Euplotes charon* в зависимости от состава вносимого корма, объем культуральной среды – 900 л

увеличение численности инфузорий (фаза замедленного роста, до 6 суток, плотность увеличивается до 1-2 тыс. экз./л), после изъятия продукции наступает сразу стационарная фаза (6-10 суток, численность остается почти на одном уровне). На 12-13 сутки инфузории перестают интенсивно размножаться, если не произвести замену 1/3 культуральной среды на свежую морскую воду. Все вышесказанное относится к культивированию трех видов инфузорий: *E. affinis*, *E. charon*, *Mesodinium pulex* (рис. 1-3). За период экспериментального культивирования р. *Euplotes* питательная среда № 1 зарекомендовала себя лучше, чем питательная среда № 2 (рис. 1). Вследствие этого, при выращивании других видов мы применяли питательную среду № 1, варьируя только концентрацией составляющих веществ.

На рисунке 1 мы представляем результаты культивирования инфузории вида *Euplotes affinis* (Dujardin, 1842).

В начале массового культивирования с применением питательных сред «лаг-фаза» отсутствовала, но имела место фаза замедленного роста (плотность увеличивалась от нескольких десятков экз./л до нескольких тысяч экз./л), продолжающаяся 4-6 суток. Далее наступала фаза ускоренного роста (4-9 суток, плотность резко возрастала до нескольких десятков тысяч или сот тысяч экз./л). И на 10-12 сутки наступала опять фаза замедленного роста, но увеличение численности культуры не прекращалось, только шло более низкими темпами, стационарная фаза отсутствовала. Следовательно, в наших вариантах культивирования имеют место только две фазы нарастания численности – замедленного и ускоренного роста. Резкое уменьшение плотности инфузорий во время кормления питательными средами мы наблюдали только после изъятия 1/2 части продукции (рис. 2). В емкостях, где использовались для кормления культуры инфузорий только кормовые дрожжи, можно было наблюдать другую картину роста популяции инфузорий. В начальный период выращивания происходит очень медленное

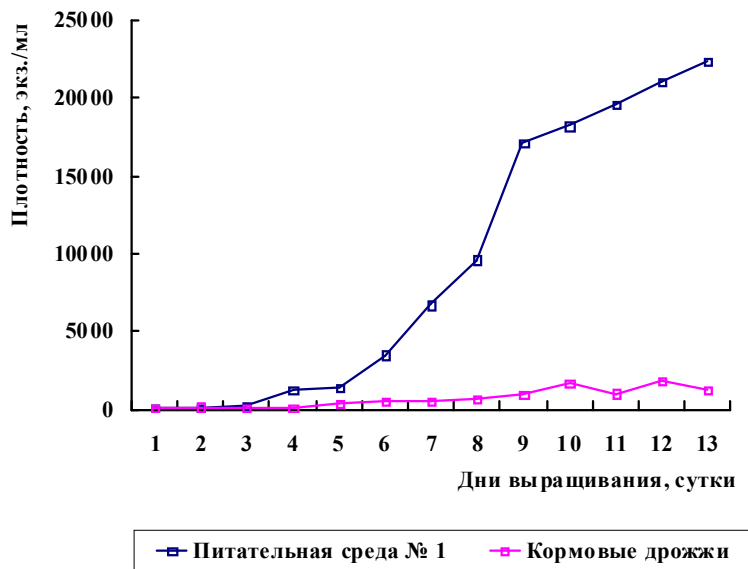


Рисунок 3. Динамика плотности *Mesodinium pulex* в зависимости от состава корма (объем – 900 л)

инфузории этого вида почти в 2 раза больше по величине, чем предыдущий вид – *E. affinis*. Второй фактор: в культуре инфузорий *E. charon* всегда присутствуют и инфузории вида *E. affinis*, которые могут вытеснить первый. Это происходит в том случае, если в питательной среде № 1 увеличить содержание глюкозы и метионина. Поэтому численность инфузорий, полученная при культивировании, более чем достаточна для того, чтобы использовать этот вид для массового выращивания.

На приведенном рисунке 2 можно проследить изменения, происходящие при удалении 1/2 продукции (сырой биомассы) на 7 сутки. Численность инфузорий, выращиваемых на питательной среде № 1, восстановилась на 10 сутки с 3500 до 1700 экз./мл, а в емкости, где для кормления применялись только кормовые дрожжи, популяция инфузорий больше не восстановила максимальную плотность.

На графическом рисунке 3 приводится динамика развития популяции инфузорий вида *M. pulex* (Claparede et Lachmann, 1858), а также можно проследить, что увеличение численности инфузорий при использовании в качестве корма питательной среды № 1 проходит без периодов «лаг-фазы» и «затухания роста». По сравнению с инфузориями вида *E. charon*, мы получили численность вида *M. pulex* на порядок выше. Можно предположить, что питательная среда № 1 в имеющихся экологических условиях лучше усваивается этим видом инфузорий. Поэтому *M. pulex* за период культивирования в 13 суток увеличивает плотность с 100-300 экз./мл до 22000 экз./мл.

На рисунке 4 мы приводим результаты выращивания инфузорий вида *Metacylis mediterranea* var. *longa* (Brandt, 1908).

По приведенному рисунку 4 видно, что инфузорий этого вида невозможно культивировать, применяя в качестве корма только кормовые дрожжи. На «чистых» кормовых дрожжах популяция данного вида не вступила даже в фазу замедленного роста. Применение питательной среды № 1 дало положительный результат. Численность популяции инфузорий медленно нарастала в период с 1 по 6 сутки от 7 экз./мл до 41 экз./мл. За период культивирования с 6 по 10 сутки плотность инфузорий возросла до 228 экз./мл.

Мы считаем, что полученные результаты по массовому культивированию инфузорий р. *Metacylis* являются положительными по нескольким причинам. Во-первых, для своей размерной группы и анатомических особенностей (живут в специализированных «домиках») численность инфузорий – более 200 экз./мл – довольно высокая, во-вторых, мы культивировали вид, используя не оптимальную соленость для данного вида, в-третьих, плотность инфузорий постоянно нарастала, даже при ежедневном удалении продукции. В-четвертых, этот вид имеет довольно крупные размеры – до 200 мкм.

Во всех наших работах инфузории размножались агамным способом (бесполое размножение) и увеличивали плотность популяции в течение длительного периода от 10 до 45 суток. Многочисленные исследования разных авторов показали, что продолжительность такого периода зависит от создания оптимальных условий выращивания. Главную роль при этом выполняет пища соответствующего качества и количества [5, 9, 21-23].

На рисунке 2 мы представляем динамику плотности инфузории *E. charon* (O.F. Muller, 1786) при выращивании с использова-

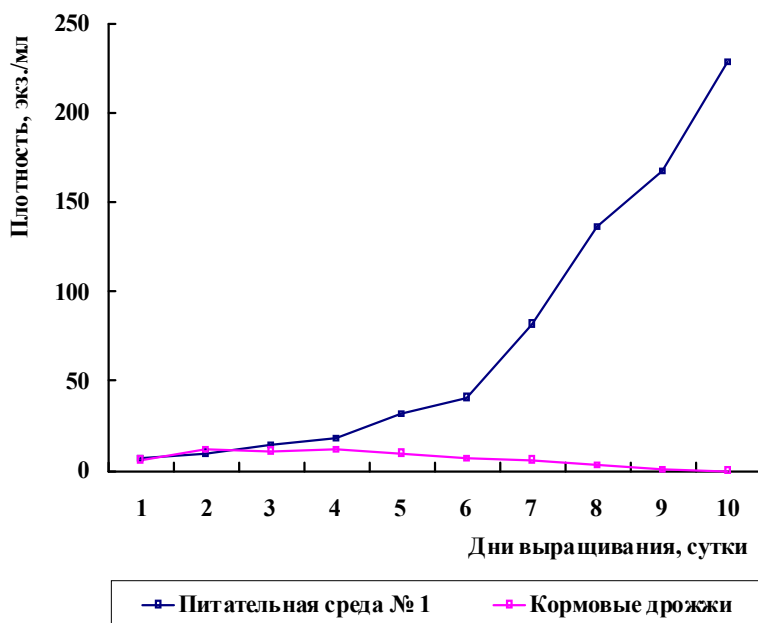


Рисунок 4. Изменение плотности инфузории *M. mediterranea* в зависимости от состава вносимого корма, объем культуральной среды 900 л

природного колебания температуры. Во вторую очередь, размерами инфузорий: *E. affinis* (30-70 мкм); *E. charon* (60-90 мкм); *Mesodinium pulex* (20-40 мкм); *Metacylis mediterranea* (80-200 мкм). Максимальная плотность, полученная при культивировании на питательных средах, составляла у вида *Euplotes affinis* – 250 экз./мл, а у *Euplotes charon* – 3500; *Mesodinium pulex* – 22360; *Metacylis mediterranea* – 228 экз./мл, соответственно. За период выращивания культур с применением в качестве корма только кормовых дрожжей, мы получили следующие результаты по максимальной плотности инфузорий: *Euplotes affinis* – 12,4 экз./мл, а у *E. charon* – 1640; *Mesodinium pulex* – 1800; *Metacylis mediterranea* – 11,5 экз./мл, соответственно. Следует обратить внимание на то, что нарастание численности фитопланктона проходило на 6 сутки, а на 10 сутки плотность микроводорослей достигала 14-20 млн. кл./л, несмотря на неблагоприятный режим температуры – 16-20 °С. При использовании в качестве корма только хлебных дрожжей фитопланктон развивался очень медленно, в количественном отношении на 10 сутки – от 2-3 млн. кл./л до 4-5 млн. кл./л. В качественном плане, при применении питательных сред за 10-20 суток до внесения маточной культуры, культуральная среда всегда принимала четкий светло-зеленый оттенок, в отличие от первоначального – бурого – цвета. Диатомовый и сине-зеленый комплекс микроводорослей заменялся на зелено-диатомовый. В начале культивирования преобладали следующие диатомовые и сине-зеленые водоросли: *Nitzschia vermicularis*, *Navicula radiosa*, *Coscinodiscus radiatum*, *Chaetoceros sp.*, *Prorocentrum micans*, *Microcystis flos-aquae*, *Oscillatoria amphibia*. На 10 сутки выращивания, после 15-20 кратного внесения среды, уже преобладали зеленые, диатомовые и одиночные сине-зеленые микроводоросли: *Dunaliella viridis*, *Chlorella vulgaris*, *Platymonas sp.*, *Chlamidomonas sp.*, *Aphanothece sp.*, *Scenedesmus sp.*, *Navicula sp.*

Следовательно, применение питательных сред в качестве корма и кораллово-ракушечных фракций на дно бассейнов в качестве подстилающего и фильтрующего слоя позволяет создать трофическую цепочку: бактериопланктон – фитопланктон – инфузории.

При массовом культивировании инфузорий мы редко наблюдали процессы конъюгации (половой процесс и ядерная реорганизация), которые обычно приводят к замедлению темпа размножения. Без обновления ядерного аппарата у инфузорий происходит гипертрофия макронуклеуса, рост и деление прекращаются. Процесс конъюгации замедляет темп увеличения численности, что нежелательно для массового культивирования. Но многочисленные исследования разных авторов еще в начале XX века показали, что продолжительность агамного (бесполого) периода размножения может быть значительно увеличена при культивировании созданием оптимальных условий существования и обновлением культуральной среды [18, 19, 22, 23]. Многие авторы от-

Таким образом, можно заключить, что различная численность культивируемых видов инфузорий, с нашей точки зрения, объясняется, в первую очередь, различными экологическими требованиями инфузорий к параметрам среды культивирования (р. *Euplotes* предпочитает соленость в диапазоне 14-22 ‰ по NaCl, *M. pulex* – 12-14 ‰, *Metacylis mediterranea* – 18-35 ‰, соответственно). При указанной выше солености инфузории встречаются в естественной среде обитания в акватории Керченского пролива. Оптимальная температура для культивирования инфузорий по В.Е. Заике составляет 20-28 °С [6]. Наши работы проводились в условиях

мечают, что бесполое размножение (деление надвое), которое обуславливает постоянное увеличение численности, происходит при наличии достаточной и легкоусвояемой пищи и благоприятной температуре. В этом случае инфузории способны давать большую продукцию, как и все простейшие [2, 5, 6].

### Выводы и рекомендации

Способы и нормативы внесения и применение удобрений в рыбоводстве начали разрабатывать еще в начале XX века. Но до сих пор остается дискуссионным вопрос о режиме и формах внесения удобрений в воды повышенной минерализации по NaCl. В своих научно-исследовательских работах по массовому выращиванию беспозвоночных гидробионтов мы опирались на способ «совместных культур» – одновременного внесения органических и неорганических удобрений и микроэлементов [3, 10].

Наши исследования показали, что прямое внесение в морскую воду различных ингредиентов не приводит к эффективным результатам.

Поэтому мы рекомендуем вносить в морскую воду питательные среды, основой которых являются минеральные и органические удобрения с различными химическими и биологическими веществами, приготовленные на морской воде и настоянные в течение 5-15 суток; кроме того, можно предположить, что:

- питательные среды эффективно воздействуют на генеративный аппарат инфузорий, благодаря тому что составляющие ингредиенты находятся в растворенном состоянии, следовательно, быстрее усваиваются организмами, что и приводит к постоянному бесполому размножению культуры популяции;
- массовое культивирование инфузорий на питательных средах позволяет проводить их выращивание даже при неоптимальной температуре;
- для выращивания инфузорий р. *Euplotes* и р. *Mesodinium* следует применять витамины группы В, глюкозу, метионин, азотнокислый натрий, кормовые дрожжи и органические удобрения;
- использование кораллово-ракушечного подстилающего слоя, а также сбалансированное внесение питательных сред благоприятно сказывается на стабилизации гидрохимических параметров водной среды и способствует созданию трофической цепи: бактериопланктон – фитопланктон – инфузории.

### Литература

1. Бурковский И.Б. Биология свободноживущих инфузорий. – М.: МГУ, 1984. – 208 с.
2. Веркман К.Х., Вильсон П.В. Физиология бактерий. – М.: Ист. литерат., 1954. – 302 с.
3. Воробьев В.И. Биогеохимия и рыбоводство. – Саратов: Литература, 1993. – 224 с.
4. Гроздов А.О., Цвылев О.Р. Методические подходы к оценке качества кормовых продуктов с использованием инфузорий // Экол.-физиол. и токсик. методы рыбох. исслед. – М.: ВНИРО, 1990. – С. 151-157, 186.
5. Догель В.А., Полянский Ю.И., Хейсин Е.М. Общая протозоология. – М.-Л.: АН СССР, 1962. – 502 с.
6. Заика В.Е. Сравнительная продуктивность гидробионтов. – К.: Наукова думка, 1983. – 205 с.
7. Епланова Г.Е., Потехина Ж.С., Васнева Ж.П. Способ культивирования инфузорий *Paramecium caudatum* // А.с. 1711750; СССР, МКИ .А 01 К 61/00; АНСССР, № 4693168/13; заявл. 28.03.89; опубл. 15.02.92, Бюл. № 6.
8. Журавлева Н.Г. Опыт подращивания личинок весенне-нерестующей мойвы // Рыбное хозяйство. – М., 1982. – № 7. – С. 38-39.
9. Кокова В.Е. Непрерывное культивирование беспозвоночных. – Новосибирск: Наука, 1983. – 168 с.
10. Константинов А.С. Общая гидробиология. – М.: Высшая школа, 1972. – 471 с.
11. Моисеев Н.Н. Выращивание живых кормов // Рыбоводство и рыбное хозяйство. – М., 2007. – № 12. – С. 43-51.
12. Новоселова Н.В. Влияние некоторых биологически активных веществ на рост популяций коловраток и инфузорий // Живые корма для объектов марикультуры : сб. науч. тр. – М.: ВНИРО, 1988. – С. 81-94.
13. Сайфулина Е.Ю. Культивирование инфузорий рода *Euplotes* для выращивания личинок морских рыб // Живые корма для объектов марикультуры : сб. науч. тр. – М.: ВНИРО, 1988. – С. 94-96.
14. Павловская Т.В. Питание и размножение массовых видов инфузорий Черного моря : автореф. дис. канд. биол. наук. – Севастополь, 1971. – 24 с.

15. Тарасов Е., Герасимова Т., Карманова Е. Инфузории – стартовый корм // Рыболовство и рыбоводство. – М., 1982. – № 5. – С. 7.
16. Чорик Ф.П., Викола М.М. Биологические основы культивирования водных организмов. – Кишинев, 1983. – С. 35-44.
17. Хлебович Т.В. Роль инфузорий в продуктивности водоемов // Зоологический журнал. – М., 1982. – Т. 67, вып. 9. – С. 356-364.
18. Calkins G. Uroleptus mobilis Engelm // Renewal of vitality through conjugation / Experimental Zoology. – 1919. – II, № 29. – Pp. 121-156.
19. Calkins G. Age and death of clones in relation to the results of conjugation // Experimental Zoology. – 1944. № 96. – Pp. 27-52.
20. Girin, J. Person-le Ruyet J. L'elevage larva ire des poisons marine chains alimentaires et aliments composes // Bulletin Francis pisciculture. – 1977. – Vol. 49, № 26. – Pp. 88-101.
21. Girin, J. Person-le Ruyet J. L'elevage larva ire des poisons marins; en ecloserie: donnees de base et tendencies atolls // Oceanic. – 1987. – Vol. 13, № 1. – Pp. 5-23.
22. Sonneborn T. Breeding systems, reproductive methods and specimens problems in Protozoa // American Association Adv. Scientific / The Species Problems : Symp. – Washers, 1987. – Pp. 155-324.
23. Szito A. The effects of abiotic and biotic factors on the productivity of full-scale Paramecium cultures // Aquaculture Hung. – 1980. – Vol. 16, № 2. – Pp. 44-49.