

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ И КАДРОВ

Учреждение образования
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»

Кафедра ихтиологии и рыбоводства

Т. В. Портная, Ю. М. Салтанов

БИОТЕХНОЛОГИЯ В РЫБОВОДСТВЕ

ВЫРАЩИВАНИЕ ЖИВЫХ КОРМОВ

*Методические указания к лабораторным занятиям
для студентов специальности
1-74 03 03 Промышленное рыбоводство*

Горки
БГСХА
2015

УДК 639.446(072)

*Рекомендовано методической комиссией
зооинженерного факультета.
Протокол № 10 от 25 июня 2014 г.*

Авторы:

кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *Т. В. Портная*;
ассистент *Ю. М. Салтанов*

Рецензенты:

доктор сельскохозяйственных наук, профессор *И. С. Серяков*;
доктор сельскохозяйственных наук, профессор *Н. А. Садо́мов*

Биотехнология в рыбоводстве. Выращивание живых кормов:
методические указания к лабораторным занятиям / Т. В. Портная,
Ю. М. Салтанов. – Горки: БГСХА, 2015. – 36 с.

Приведены инновационные методы культивирования инфузорий, ракообразных, дрозофилы, коловраток. Определены цель, материалы и оборудование, задание, контрольные вопросы для каждого лабораторного занятия.

Для студентов специальности 1-74 03 03 Промышленное рыбоводство.

© УО «Белорусская государственная
сельскохозяйственная академия», 2015

ВВЕДЕНИЕ

Важной проблемой индустриальной аквакультуры является проблема обеспечения кормами, особенно живыми. Одним из путей увеличения естественных кормовых ресурсов и повышения продуктивности прудов является массовое культивирование живых кормов, а также широкое использование инновационных методов направленного воздействия на естественную кормовую базу прудов путем интродукции высокопродуктивных водных беспозвоночных.

Живой корм, представляющий собой совокупность растительных и животных гидробионтов (микроорганизмы, водоросли и беспозвоночные животные), можно получать в нужном количестве и в необходимые сроки. Живые корма разводят как в рыбоводных водоемах, так и в специальных культиваторах.

Методические указания включают темы по исследованию особенностей биологии и методов культивирования микроводорослей, инфузорий, артемий, ветвистоусых рачков. В процессе выполнения заданий студент должен освоить методы, способы, изучить оборудование для культивирования живых кормов как в лабораторных, так и в производственных условиях. Темы лабораторных работ входят в два модуля: микроводоросли, *Artemia salina* и *Drosophila melanogaster*; простейшие, коловратки и ракообразные.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Богатова, И. Б. Рыбоводная гидробиология / И. Б. Богатова. – М.: Пищевая промышленность, 1980. – 165 с.
2. Кокова, В. Е. Непрерывное культивирование беспозвоночных / В. Е. Кокова. – Новосибирск: Наука, 1982. – 34 с.
3. Микулин, А. Е. Живые корма / А. Е. Микулин. – М.: Дельфин, 1994. – 104 с.
4. Плонский, В. Д. Мир аквариума. Большая иллюстрированная энциклопедия. – М.: Аквариум ЛТД, 2000. – 640 с.
5. Привезенцев, Ю. А. Интенсивное прудовое рыбоводство: учебник для вузов / Ю. А. Привезенцев, В. А. Власов. – М.: Мир, 2004. – 456 с.
6. Спектрова, Л. В. Живые корма для рыб и беспозвоночных / Л. В. Спектрова. – М.: Агропромиздат, 1990. – 175 с.

Тема 1. ТЕХНОЛОГИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ХЛОРЕЛЛЫ

Цель занятия: изучить питательные среды для культивирования микроводорослей и овладеть методикой их приготовления.

Материалы и оборудование: стеклянные закрывающиеся емкости на 1 л, культура хлореллы, реактивы для приготовления питательных сред, дистиллированная вода, аналитические весы, микроскопы, предметное и покровное стекла, пинцеты, стеклянные палочки-лопаточки, мерная кружка.

Задание: 1) рассмотреть и зарисовать хлореллу; 2) изучить состав различных питательных сред; 3) приготовить различные питательные среды и внести культуру хлореллы; 4) законспектировать, пользуясь методическими указаниями и рекомендуемой литературой, состав питательных сред и методику их приготовления; 5) изучить оборудование для культивирования микроводорослей.

Хлорелла – одноклеточная водоросль, широко распространенная в природе. Для массового культивирования применяют в основном *Clorella vulgaris*, *Clorella purenoidosa*.

Хлорелла относится к числу просто организованных одноклеточных зеленых водорослей.

Клетки мелкие – от 2 до 10 мкм. Размножение бесполое. При благоприятных условиях новые клетки из материнской образуются через 6–8 часов и водоросль может создавать большую биомассу, богатую различными питательными веществами. Хлорелла содержит около 50 % белка, хотя его количество может варьировать в зависимости от условий культивирования и в первую очередь от освещения и состава питательной среды. Жиры содержатся от 7 до 20 %, углеводов (в основном за счет гемицеллюлозы и крахмала) – до 20 %, золы – до 12 %. В состав клеток входят 23 аминокислоты. Особенно много в клетках хлореллы витаминов группы В, С, РР, Е, Д, а также каротина.

Хлорелла – типичный фотоавтотроф, развивающийся только при естественном или искусственном освещении на жидкой минеральной питательной среде, содержащей азот, фосфор, серу, железо, магний и другие макро- и микроэлементы, при постоянной подаче углекислого газа и отводе образующегося кислорода.

Необходимым условием является поддержание температурного режима и величины рН питательной среды. В зависимости от температуры штаммы хлореллы делят на термофильные, мезофильные и криофильные. Для термофильных оптимальная температура выращи-

вания составляет 35–37 °С, для мезофильных – 25–27 °С, для криофильных – 10–15 °С.

Величина рН в процессе культивирования должна поддерживаться в диапазоне 5,5–6,5. Коррекция производится фосфорной и азотной кислотой при повышении рН, раствором гидрата окиси калия при понижении рН.

Так как углекислый газ является основным, а иногда и единственным поставщиком углерода, то интенсивно хлорелла может развиваться только при достаточном для этого процесса количестве углекислого газа, растворенного в питательной среде.

Мелкие промышленные установки и лабораторные культиваторы обычно используют баллонный углекислый газ, который подается в виде смеси с воздухом при содержании 2–5 % углекислоты или в чистом виде. Также одним из важнейших факторов процесса культивирования хлореллы является световой фактор. Только в условиях освещения в хлорелле из неорганических веществ, углекислоты, воды, минеральных компонентов синтезируются белки, жиры, витамины и углеводы.

Для выращивания хлореллы можно использовать прудовую воду, воду ручьев и колодцев. Наиболее пригодной является колодезная вода, так как в ней содержится достаточно растворимых микроэлементов и очень мало микроорганизмов. Водопроводную воду использовать нежелательно, так как в ней много хлора.

Хлореллу можно выращивать как на минеральных средах, так и на средах естественных органических удобрений, можно использовать отходы животноводческих и птицеводческих комплексов, а также бытовые и промышленные сточные воды.

Для культивирования водорослей существует много питательных сред, основными элементами которых являются N, P, S, Mg, Fe. Независимо от применяемой среды особое внимание при выращивании водорослей должно быть обращено на азотное и фосфорное питание.

Питательные среды, предназначенные для автотрофного культивирования микроводорослей, представляют собой комбинации растворов солей и содержат необходимые для нормального развития элементы.

Наряду с неорганическими солями, в качестве источника азота используются мочевины, а также добавки биологически активных веществ.

Оптимальной считают среду, химический состав которой наиболее полно удовлетворяет физиологические потребности культуры. Основ-

ное требование, предъявляемое к среде заключается в том, чтобы концентрация питательных элементов в результате не лимитировала скорость биосинтеза клеток.

Различные систематические группы микроводорослей имеют неодинаковый биохимический состав, что отражается и на потребности различных водорослей в макро- и микроэлементах. Достаточное обеспечение водорослей биогенами является обязательным условием успешного ведения процесса культивирования. От условий минерального питания зависит как интенсивность роста, так и направленность биосинтеза культуры.

Для обеспечения роста и нормального химического состава микроводорослей требуется наличие в среде в доступной форме 10–20 минеральных элементов (количество необходимых элементов варьирует в зависимости от вида водорослей). Питательные элементы делятся на макро- (они используются клеткой прямо или косвенно в качестве основного строительного материала) и микроэлементы (они входят в состав ферментов, пигментов и необходимы для осуществления некоторых процессов в клетке).

Элементы N, P, Mg, K, S, Fe, Cu, Ca, Mn и Mo являются необходимыми для всех водорослей. Для некоторых видов водорослей K и Ca могут быть заменены на Na и Mg.

Исследование потребности хлореллы в элементах питания на средах, сбалансированных по макро- и микроэлементам, показало, что на 1 кг сухой биомассы водорослей приходится 90–100 г N, 8–10 г K, 6–8 г P, 4–5 г Mg, 5–6 г S, 300–400 мг Fe, 30–50 мг Mn, 3–5 мг Cu, 15–30 мг Zn, 0,4–0,5 мг Mo. Эти данные можно использовать для расчета потребности хлореллы в элементах питания на сбалансированных питательных средах.

По соотношению катионов и анионов, пропорции элементов и близости к элементарному составу клеток культивируемых микроводорослей различают несбалансированные и сбалансированные среды.

Примером несбалансированной среды служит среда Тамия, в которой в качестве источника азота используется нитрат калия. Поскольку для синтеза своей биомассы микроводорослей требуется азота намного больше, чем других элементов, то от источника азота зависит в большей степени изменение pH питательного раствора. Причина дисбаланса среды Тамия заключается в начальном избытке ионов калия, который усиливается в процессе культивирования. Поскольку нитрат калия – щелочная соль, выращивание микроводорослей на среде Тамия

сопровождается повышением рН раствора, накоплением в нем карбонатных и бикарбонатных ионов. Повышение рН приводит к выпадению в осадок Р и Mg, т. е. культивирование на среде Тамия приводит к значительному изменению начального соотношения ионов, дефициту одних элементов и избытку других. По мере снятия части урожая биомассы и добавления в фоновый раствор новых порций среды этот дисбаланс усиливается, что при длительном культивировании приводит к значительному угнетению роста водорослей.

К сбалансированным средам относится сбалансированная среда № 3. Она обеспечивает интенсивный рост хлореллы без существенных изменений рН питательного раствора. Все макроэлементы используются более или менее одновременно.

Самыми распространенными являются следующие среды: Кнопа, Пратта, Тамия, Майерса, ЛГУ, Ягужинского, сбалансированная № 3 (табл. 1).

Таблица 1. Рецепты питательных сред для водорослей, г/л

Вещество	Среды						
	Кнопа	Пратта	Тамия	Майерса	№ 3	Ягужинского	ЛГУ
Ca(NO ₃) ₂	0,25	–	–	–	–	–	–
CaCl ₂ × ×2H ₂ O	–	–	–	–	–	–	–
MgSO ₄ × ×7H ₂ O	0,06	0,01	2,5	1,204	0,75	0,1	0,3
K ₂ HPO ₄	–	0,01	–	–	–	–	0,3
KH ₂ PO ₄	0,06	–	1,25	1,224	1,5	–	–
KCl	0,08	–	–	–	–	–	–
KNO ₃	–	0,1	5,0	1,213	–	0,5	2
NH ₄ NO ₃	–	–	–	–	–	–	–
NH ₂ CONH ₂	–	–	–	–	0,3	–	–
FeSO ₄ × ×7H ₂ O	–	–	0,003	–	–	0,002	–
Fe ₂ (SO ₄) ₃	–	–	–	0,0747	–	–	–
FeCl ₃	Следы	Следы	–	–	Следы	–	–
Раствор микроэлементов	–	–	0,0001	0,00005	–	–	0,00005
ЭДТА	–	–	0,037	–	–	–	0,01

Примечание. Раствор микроэлементов: H₃BO₃ – 2,86 г/л; MnCl₂·4H₂O – 1,81 г/л; ZnSO₄·7H₂O – 0,222 г/л; MoO₃ – 176,4 мг/10 л; NH₄VO₃ – 229,6 мг/10 л.

Хлореллу можно культивировать как под открытым небом, так и в помещениях. Для массового культивирования хлореллы под открытым небом могут быть использованы установки самой различной формы и размеров. Для их изготовления пригодны различные материалы: кирпич, бетон, дерево, органическое стекло и др.

Таким образом, существуют культиваторы открытого и закрытого типа (рис. 1). Открытые – это установки, в которых суспензия водорослей не изолирована от атмосферы. Они дешевы в изготовлении, просты в конструкции, но при их использовании трудно следить за оптимизацией и стабилизацией факторов роста водорослей, культура легко заряжается, и получается суспензия с низкой плотностью.

Конструкции культиваторов закрытого типа обеспечивают возможность направленного регулирования параметров выращивания, что открывает перспективу резкого повышения урожая с единицы объема при более экономном расходовании химикатов и углекислого газа, увеличения плотности суспензии, улучшения ее качества вне зависимости от внешних условий.

Конструкции культиваторов для микроводорослей разнообразны, но в общей схеме содержат следующие основные функциональные системы и блоки:

- 1) реактор;
- 2) системы освещения, питания культуры, газообмена, термостабилизации, перемешивания культуры, отбора урожая, контроля и управления;
- 3) вспомогательное оборудование.

Реактор представляет собой резервуар, в котором происходят рост и размножение культуры микроводорослей. Наибольшее распространение на производстве получили реакторы в виде плоскопараллельных кювет, стеклотрубчатых систем, разнообразные горизонтальные бассейны и пр.

Система освещения включает источник света и устройства для его распределения и отражения.

Система питания предназначена для поддержания концентрации растворенных в воде питательных веществ в пределах, не вызывающих лимитирование или ингибирование роста микроводорослей.

Система состоит из емкостей для питательной среды и дозаторов, обеспечивающих добавление в реактор определенного объема питательной среды при одновременном отборе такого же объема культуры.

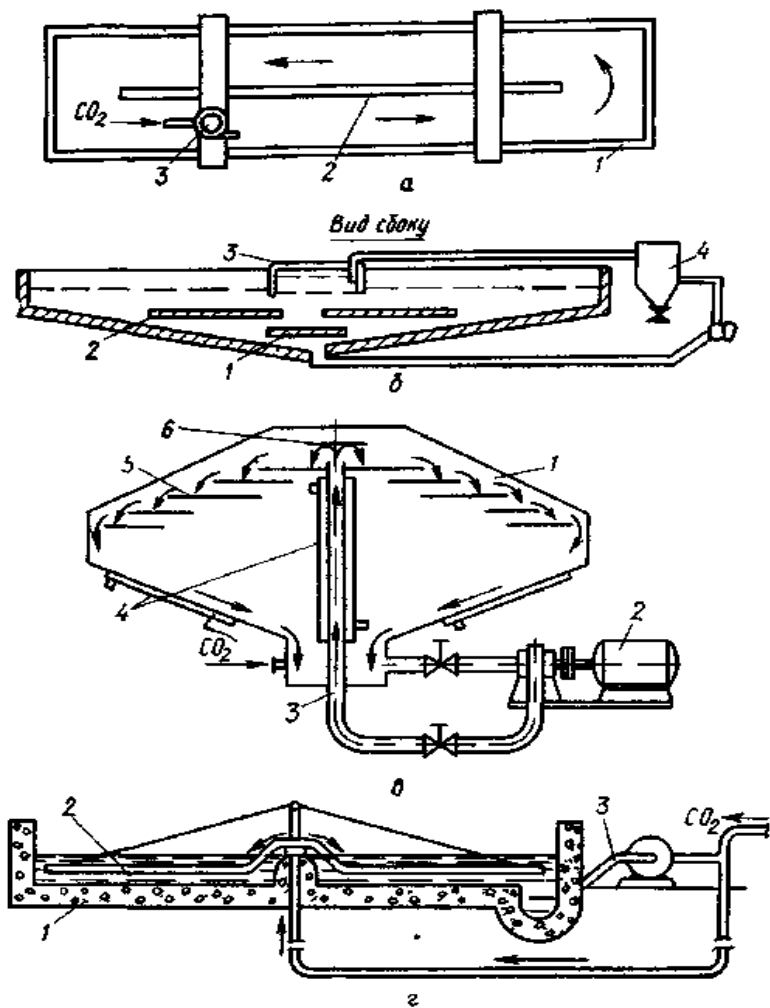


Рис. 1. Устройства для культивирования микроводорослей:

а – культиватор ЛГУ: 1 – корпус; 2 – неполная срединная перегородка; 3 – насос;

б – культиватор ВНИИПРХ-64: 1 – дисковая перегородка; 2 – кольцевая перегородка; 3 – газовый колпак; 4 – насос;

в – культиватор ВНИИБиотехники: 1 – корпус; 2 – насос; 3 – нагревательная труба; 4 – теплообменники; 5 – сточный конус; 6 – насадка;

г – японский культиватор: 1 – круглый бассейн; 2 – вращающиеся перфорированные трубки; 3 – насос

Система газообмена включает источник углекислого газа (газобаллоны, топливные газы, биологические объекты), компрессор, расходомеры, магистрали движения газоздушнoй смеси.

Система термостабилизации предназначена для поддержания температуры суспензии микроводорослей в оптимальных пределах.

Система перемешивания предназначена для улучшения питания и дыхания клеток суспензии микроводорослей, создания более равномерного облучения клеток светом, уменьшения оседания на поверхность реактора.

Производство микроводорослей включает ряд операций:

- 1) подготовка питательной среды;
- 2) приготовление инокулянта;
- 3) зарядка и запуск культиватора;
- 4) культивирование и выдача готовой продукции;
- 5) регулярная чистка и обеззараживание технологического оборудования.

В настоящее время разработано большое количество культиваторов для интенсивного выращивания микроводорослей. Специалистами ЛГУ предложена недорогая установка для массового культивирования микроводорослей, представляющая собой прямоугольный каркас, выстланный полиэтиленовой пленкой и не полностью перегородженный посредине для создания циркуляции. Перемешивание суспензии осуществляется насосом, расположенным в одной из половинок культиватора, что обеспечивает непрерывную циркуляцию суспензии. Подача углекислого газа производится из баллона непосредственно под двигатель.

В лабораторных условиях для культивирования микроводорослей применяется и культиватор закрытого типа. Установка состоит из двух плоскопарных кювет объемом 8 л каждая, между ними помещен светильник. Культура постоянно перемешивается воздухом, который подают со скоростью 2,5 л/мин на 1 л культуры. Один раз в сутки культуру сливают и доливают свежую питательную среду, а 2–3 раза в сутки в культиватор вносят мочевины из расчета 0,25 г/л. Ежесуточная продуктивность культуры при таком режиме составляет 8 г сухой или 24 г сырой биомассы с 1 л среды.

Урожайность водорослей колеблется в широких пределах – от 2 до 20 г сухого вещества на 1 м² в сутки.

Хлорелла используется в рационах сельскохозяйственных животных и птицы. Доказано положительное действие хлореллы на общее

физиологическое состояние и увеличение приростов животных. Животным хлореллу можно скармливать в виде суспензии, пасты, а также сухой биомассы. Она применяется как биостимулятор (увеличение приростов живой массы), а также в ветеринарных и профилактических целях (хлорелла обладает бактерицидным действием).

В Японии используют хлореллу в производстве кондитерских изделий и отдельных молочных продуктов.

В рыбоводстве на суспензии хлореллы выращивают многих беспозвоночных, которые в дальнейшем используются для кормления рыб.

Контрольные вопросы

1. Какие штаммы хлореллы используются для массового культивирования?
2. Каковы оптимальные температура и рН для выращивания хлореллы?
3. Чем производится коррекция рН среды?
4. Перечислите основные питательные среды для культивирования микроводорослей.
5. Каковы достоинства и недостатки открытых и закрытых культиваторов?
6. В каких целях используется хлорелла?

Т е м а 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОМАССЫ И УРОЖАЙНОСТИ ХЛОРЕЛЛЫ

Цель занятия: овладеть методикой определения биомассы и урожайности водорослей.

Материалы и оборудование: культивируемая культура *Clorella*, счетная камера Горяева, микроскоп, предметные и покровные стекла, электронные весы, дистиллированная вода, бюксы, мерная кружка.

Задание: 1) изучить способы определения биомассы и урожайности водорослей; 2) определить урожайность хлореллы методом прямого подсчета клеток в камере Горяева; 3) определить сухое вещество клеток весовым методом; 4) законспектировать, пользуясь методическими указаниями и рекомендуемой литературой, методики определения биомассы и урожайности водорослей.

Интенсивность биосинтеза количественно выражается продуктивностью микроводорослей в граммах на единицу объема или площади

за единицу времени. Существуют несколько способов оценки урожая микроводорослей:

- подсчет клеток в счетной камере под микроскопом;
- весовое определение биомассы;
- измерение оптической плотности суспензии.

Иногда используют два или более метода оценки урожая одновременно. Определение биомассы по оптической плотности производят при помощи датчиков оптической плотности непрерывного и дискретного действия. Часто в качестве датчика используют фотоэлектроколориметры с зеленым светофильтром, иногда с некоторыми конструктивными изменениями. Полученные в результате измерений величины экстинкции по калибровочной кривой переводят в число клеток в миллилитре суспензии (для каждой культуры существует своя калибровочная кривая соотношения оптической плотности и сухой массы клеток).

Чаще всего для определения биомассы и урожайности водорослей используют метод прямого подсчета водорослевых клеток в определенном объеме суспензии, хотя по причинам объективного и субъективного характера ошибка при подсчете составляет 10–15 %. Поскольку в зависимости от условий выращивания размер водорослевых клеток может сильно варьировать, целесообразно метод прямого подсчета подкреплять определением сухой биомассы клеток.

Микроскопирование культуры для подсчета клеток проводят при окуляре 7^x и объективе 20^x, используя специальные счетные камеры (Горяева, Тома, Фукса – Розенталя, Бюркера и др.).

При густом росте суспензию разбавляют в 10–15 раз дистиллированной водой. Среднее число клеток в одном квадрате умножают на разведение. Число клеток водорослей записывают по форме, представленной в табл. 2.

Таблица 2. Среднее число клеток в пробе

Номер пробы	Повторность	Число клеток в квадратах										Среднее число клеток в одном квадрате
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	1											
	2											
	3											
Среднее число клеток в пробе из трех повторностей												

Число выросших клеток микроводорослей учитывают в 1 мл культуры. Для этого среднее число клеток в пробе делят на 2 и умножают на 10^4 . Подсчет проводят в трех повторностях и за конечный результат принимают среднее число клеток.

Сухое вещество клеток суспензии определяют весовым методом, для этого 20–40 см³ суспензии центрифугируют в течение 10 мин при скорости 3–4 тыс. об/мин. После слива жидкости в центрифужный стакан с осадком добавляют при тщательном перемешивании в два приема 20–40 см³ воды и снова центрифугируют. Фугат сливают, а осадок с небольшими порциями дистиллята переносят в доведенные до постоянного веса бюксы, которые помещают в термостат и доводят при постоянной температуре (80–105 °С) до постоянного веса. Содержание сухого вещества выражают в миллиграммах на литр суспензии.

Величины урожайности, приводимые разными авторами, сильно варьируют (7,7–16 г/м²), что объясняется неидентичностью условий выращивания, использованием различных штаммов одного и того же вида водорослей, конструктивными различиями установок при культивировании, разными сроками выращивания, режимом культивирования и применявшимися питательными средами.

Контрольные вопросы

1. Какие существуют способы оценки урожая микроводорослей?
2. Как проводится определение биомассы по оптической плотности суспензии?
3. В чем сущность метода прямого подсчета водорослевых клеток?
4. Как осуществляется весовой метод определения биомассы микроводорослей?

Тема 3. ПОЛУЧЕНИЕ НАУПЛИУСОВ ARTEMIA SALINA ПУТЕМ ИНКУБАЦИИ ЯИЦ

Цель занятия: изучить биотехнику получения науплиусов артемии салина.

Материалы и оборудование: яйца *Artemia salina*, трехлитровая банка, аэратор, соль, весы, вода, плакаты, рисунки.

Задание: 1) изучить биологическую характеристику артемии салина; 2) рассмотреть и зарисовать рачка артемии салина; 3) изучить и законспектировать, пользуясь методическими рекомендациями, основ-

ные этапы биотехники получения науплиусов артемии; 4) инкубировать яйца артемии салина.

Одним из самых распространенных и универсальных видов живого корма является листоногий рачок *Artemia salina*. Он обладает высокой калорийностью и содержит все необходимые питательные вещества. Его широко используют в качестве стартового корма для личинок многих видов рыб. В водоемах разных климатических зон имеются большие запасы яиц артемии. Существуют определенные методики сбора, хранения, а также инкубации яиц и использования рачков в кормовых целях.

Взрослые рачки имеют вытянутую форму тела и достигают длины 10–15 мм (рис. 2).

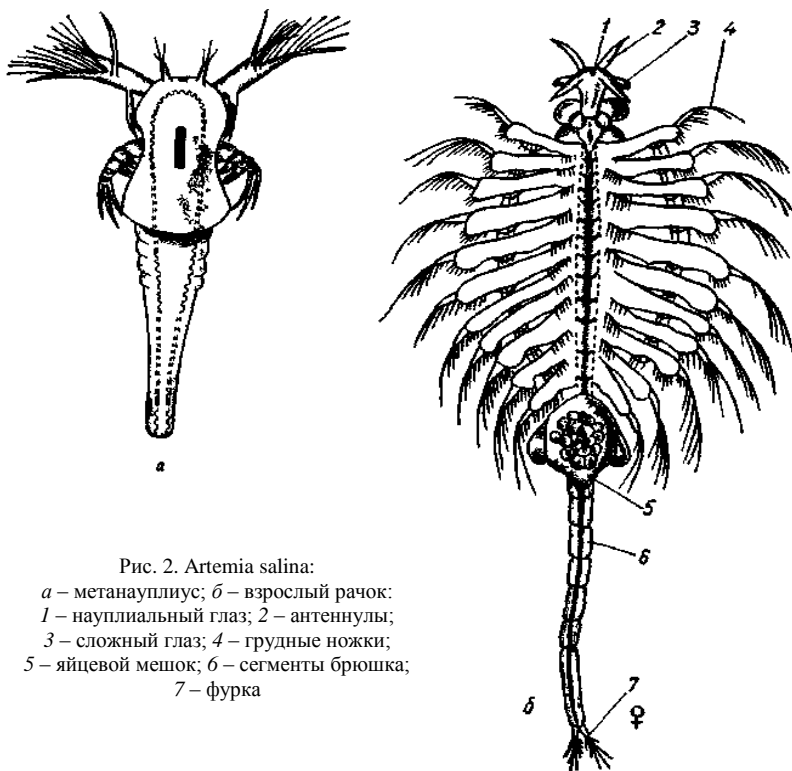


Рис. 2. *Artemia salina*:

- a* – метанауплиус; *б* – взрослый рачок;
1 – науплиальный глаз; 2 – антеннулы;
3 – сложный глаз; 4 – грудные ножки;
5 – яйцевой мешок; 6 – сегменты брюшка;
7 – фурка

Тело разделено на три отдела: грудь, голову и брюшко. На голове имеется один непарный (науплиальный) глаз и два больших сидящих на стебельках сложных глаза, антеннулы и антенны и ротовые части. Грудной отдел состоит из одиннадцати сегментов, на каждом из которых находится по паре листовидных ножек. Наружные придатки грудных ножек выполняют дыхательную функцию, внутренние – служат для движения и отфильтровывания пищи. Брюшко состоит из 8 сегментов и не имеет конечностей. Первые два сегмента брюшка слиты в один половой сегмент, на котором у самок находится яйцевой мешок, а у самцов – совокупительный орган. Брюшко заканчивается концевой пластинкой, от которой отходят две ветви – фурки, оперенные многочисленными щетинками.

Окраска рачков определяется характером потребленной пищи, а также концентрацией растворенного в воде кислорода и варьирует от зеленоватой до красной.

Биотехника массового получения науплиусов *Artemia salina* включает следующие основные этапы: заготовку и очистку яиц; хранение; активацию; инкубацию яиц. Они тесно связаны между собой и представляют единый процесс.

Заготовка и очистка яиц. Сбор артемии начинается с момента массового появления диапаузирующих яиц. Вылов яиц из воды можно начинать со второй половины лета, все осенние и зимние месяцы и ранней весной до прогревания воды до 10–14 °С и выклева первых науплиусов. Наилучшее время для сбора яиц артемии – осень.

Сбор яиц артемии на берегу не представляет большой сложности. Наиболее чистые яйца находятся в свежих выбросах и толще воды, где количество доброкачественных составляет 80–95% от общей массы. Свежие выбросы следует искать на пологих подветренных берегах, особенно много яиц скапливается в естественных ловушках (косы, небольшие заливы и бухточки). Выбросы имеют вид полосы, идущей параллельно береговой линии. Свежие выбросы имеют желтоватую окраску, старые – серую или коричневую.

Свежие яйца из выбросов на берегу осторожно собирают лопатой или савочком, не захватывая грунт.

Запасы яиц артемии сильно варьируют на отдельных водоемах или на одном водоеме в разные годы. Рационально, изымая яйца из водоема, оставлять определенную часть для естественного воспроизводства. Неоправданно интенсивная заготовка яиц привела к подрыву запасов артемии в уникальном водоеме – Большом Соленом озере

(штат Юта, США), являющемся основным поставщиком яиц артемии на мировом рынке.

При производственном получении науплиусов для кормления личинок рыб важное значение имеет процент выклева.

Яйца, собранные летом или осенью, дают без специальной обработки 3–5 % выклева, несмотря на высокое содержание в них живых эмбрионов.

Прежде чем приступить к заготовке яиц, следует определить степень их доброкачественности, так как даже при осмотре под лупой мертвые яйца и нераскroшившаяся скорлупа схожи с доброкачественными.

Существуют три способа определения качества сбора.

1. Яйца раздавливают между двумя предметными стеклами и рассматривают в лупу 10–15-кратного увеличения. Наличие жирных пятен свидетельствует о том, что яйца живые (нельзя путать с пятнами, оставшимися при раздавливании скорлупы яиц, заполненной через трещину вязким светлым илом).

2. Часть яиц опускают в прозрачный сосуд (пробирку или стакан) с пресной водой. Скорлупа всплывает вверх, а доброкачественные яйца опускаются на дно (иногда заполненная илом скорлупа также опускается на дно).

3. Небольшое количество яиц зажимают между подушечками двух пальцев, затем делают несколько перетирающих движений и яйца рассматривают непосредственно на пальце через лупу 10–15-кратного увеличения. Если материал скатывается в веретенца или рассыпается на чешуйки, он недоброкачественный, если остался в виде отдельных яиц – доброкачественный.

Очистку проводят несколькими способами. Вначале яйца очищают при помощи сит, но это не обеспечивает удаление всех нежелательных примесей (остаются идентичные размерам яиц примеси).

После механической очистки применяют очистку по удельной массе. В пресной воде пустые скорлупки всплывают вверх, а яйца и частицы песка оседают на дно (в течение часа происходят набухание яиц и их осадка на дно). В соленой воде живые яйца всплывают в верхний слой воды, а песок оседает на дно.

Хранение яиц. Большое количество покоящихся яиц целесообразно хранить в сухом виде. Влажность высушенных яиц не должна превышать 5 %. Высушенные яйца хранят в мешках из плотной ткани в сухом помещении при комнатной или более низкой температуре.

Активация яиц. Активация яиц артемии салина – основной момент биотехники массового получения науплиусов. Активирующее действие на яйца оказывает свет и химические реагенты: сода, бура, органические растворители – ацетон, бутанол, этиловый эфир. В последние годы для активации яиц используют перекись водорода. После 15-минутной обработки 3%-ным раствором перекиси и последующего высушивания выклев науплиусов при инкубации в 5%-ном растворе NaCl, аэрации и температуре 26 °C составил 100 % от живых эмбрионов.

При обработке бурой выклев колеблется от 9 до 43 %, ацетоном – до 15 %, содой – 13 %. Облучение ультрафиолетовыми лучами и промораживание не оказывают положительного влияния на выклев.

Инкубация яиц. Обычно яйца артемии инкубируют в 3–5%-ном растворе NaCl или Na₂SO₄.

Для инкубации яиц необходимо высокое содержание кислорода в воде, которое обеспечивается непрерывной продувкой солевого раствора с содержащимися в нем яйцами воздухом или кислородом. Плотность загрузки инкубационных устройств при хорошей аэрации может достигать 10 г сухих яиц на 1 л инкубационной среды.

Контрольные вопросы

1. Биологическая характеристика *Artemia salina*.
2. Способы определения качества собранных яиц *Artemia salina*.
3. Кто является основным поставщиком яиц *Artemia salina*?
4. Основные этапы получения науплиусов *Artemia salina*.
5. Заготовка и очистка яиц *Artemia salina*.
6. С какой целью проводят активацию яиц *Artemia salina*?

Тема 4. СПОСОБЫ И УСТРОЙСТВА ДЛЯ ИНКУБАЦИИ ЯИЦ АРТЕМИИ САЛИНА

Цель занятия: изучить способы и устройства для инкубации яиц артемии салина.

Материалы и оборудование: рисунки, плакаты, аппарат Вейса.

Задание: 1) ознакомиться с устройством аппаратов для инкубации яиц артемии салина; 2) рассмотреть и зарисовать аппараты для промышленного получения науплиусов артемии салина.

Обычно яйца артемии инкубируют в 3–5%-ном растворе хлорида

или сульфата натрия. Для инкубации яиц необходимо высокое содержание кислорода в воде, которое обеспечивается непрерывной продувкой солевого раствора с содержащимися в нем яйцами воздухом или кислородом. Плотность загрузки инкубационных устройств при хорошей аэрации может достигать 10 г сухих яиц на 1 л инкубационной среды.

Для инкубации яиц артемии салина предложены различные способы и устройства. Главная трудность заключается в разработке приспособлений для отделения науплиусов от пустой скорлупы и не вылупившихся яиц.

Наиболее пригодны для массового инкубирования аппараты, в которых процесс инкубации и отделение выклюнувшихся науплиусов от скорлупы и яиц происходит в одной и той же емкости (обычно в стеклянных сосудах различного типа). В качестве примера можно привести инкубатор Хаслина (рис. 3, а; 3, б), в котором отделение науплиусов от скорлупы и яиц происходит по разности удельных весов в одном и том же сосуде. Более легкая скорлупа всплывает на поверхность, не проклюнувшиеся яйца опускаются в нижние слои, а науплиусы плавают в толще воды в средней части инкубатора.

Инкубатор состоит из сосуда, имеющего форму перевернутого конуса. В нижнюю часть сосуда через горловину входит воздухопровод, заканчивающийся диффузором, наружный конец воздухопровода соединен с компрессором. Инкубационный сосуд в рабочем положении устанавливается на стойке и закрывается крышкой с отверстиями для выхода воздуха. Перед началом инкубации яиц сосуд заливают солевым раствором, близким по составу к морской воде.

После включения компрессора воздух по воздухопроводу попадает в диффузор и переходит в воду в виде мелких пузырьков, которые помимо аэрации поддерживают яйца во взвешенном состоянии и не позволяют им опускаться на дно сосуда. После 48 ч инкубации и выключения компрессора скорлупа яиц всплывает на поверхность, не проклюнувшиеся яйца оседают на дно между диффузором и стенками сосуда. Выклюнувшиеся науплиусы находятся в толще воды.

При массовой инкубации яиц артемии салина целесообразно использовать стеклянные сосуды типа аппаратов Вейса (рис. 3, в) емкостью 6–8 и 40 л. В аппарат Вейса заливают 3–5%-ный раствор сульфата или хлорида натрия, вносят яйца и включают аэрацию.

Аэрация идет при помощи компрессора, воздуховода и диффузора. Воздуховод с диффузором вводится в сосуд сверху, причем диффузор

опускается в нижние слои раствора соли. Яйца сначала всплывают на поверхность, а затем по мере набухания опускаются в толщу воды и там постоянно перемешиваются при помощи барботажной воды сжатым воздухом. После окончания инкубации и выклева науплиусов (48 ч) диффузор извлекают из сосуда, а его содержимое сливают через сачок из мельничного газа № 60 и переносят в такой же аппарат с пресной водой, где происходит разделение науплиусов и яиц.

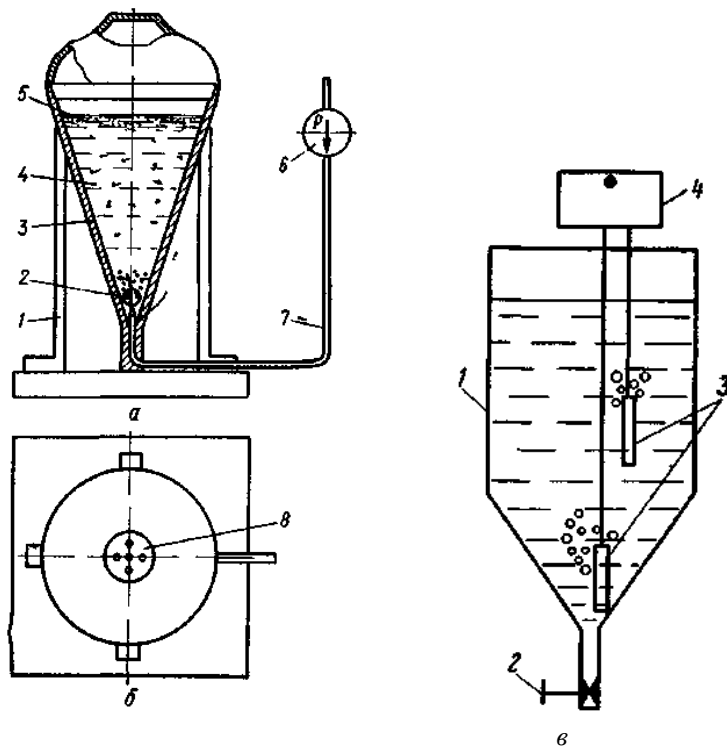


Рис. 3. Устройство для инкубации яиц артемии салина:
a – общий вид аппарата Хаслина; *б* – вид сбоку: 1 – стойка; 2 – диффузор;
 3 – инкубационный сосуд; 4 – слой воды с науплиусами; 5 – поверхностный слой с оболочками яиц; 6 – компрессор; 7 – воздуховод; 8 – отверстия в верхней крышке инкубационного сосуда; *в* – аппарат Вейса: 1 – инкубационный сосуд; 2 – сливной кран; 3 – диффузор; 4 – компрессоры

Средний суточный съем науплиусов составляет 9–10 г/л. В пере-

счете на общепринятую единицу продуктивности культуры живых кормов это составит 9–10 кг/м³ в сутки.

При хорошем качестве яиц суточный съем достигает 25 г/л, а отношение массы яиц к массе науплиусов равно 1:2.

Успех инкубации зависит от комплекса методических приемов, составляющих единую биотехнику массового получения науплиусов этого рачка для кормления личинок рыб на ранних стадиях развития. Эффективность использования этого живого корма зависит от правильного сбора, очистки, хранения и активации яиц и на последнем этапе – от конструктивных особенностей инкубационных аппаратов и технологии инкубации.

Контрольные вопросы

1. Назовите аппараты для инкубации яиц артемии салина.
2. Как устроен аппарат Хаслина?
3. Как происходит отделение науплиусов от яиц и скорлупы при инкубировании в аппарате Хаслина и в аппарате Вейса?

Тема 5. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ДРОЗОФИЛЫ

Цель занятия: изучить и усвоить особенности культивирования дрозофилы.

Материалы и оборудование: стеклянные емкости не менее чем на 2 л, крышки для емкостей, компоненты питательных сред (кожура от банана, порченные яблоки, варенье, желатин (6 г), манная крупа (40 г), сахар (30 г), дрожжи (30 г), вода (1 л), полоски плотной бумаги, электроплита, культура плодовой мушки, лупа, чашки Петри.

Задание: 1) изучить и законспектировать особенности биологии дрозофилы; 2) овладеть методикой приготовления питательных сред для культивирования дрозофилы; 3) приготовить питательные среды для выращивания плодовой мушки; 4) рассмотреть под микроскопом дрозофилу, отобрать двух половозрелых особей и зарисовать; 5) заложить опыт.

Мелкая плодовая мушка – дрозофила (*Drosophila melanogaster*) – хороший корм для живородящих рыб и мальков. Она относится к типу членистоногих, подтипу трахейнодышащих (*Tracheata*), семейству дрозофилы (*Drosophilidae*).

Они часто появляются в массе на порченных фруктах и овощах. Это весьма мелкие (длина тела 1,5–4 мм), очень нежные насекомые. В качестве корма могут быть использованы как взрослые насекомые, так и их личинки. Личинка белого цвета, размер ее не превышает 3,5 мм.

Содержать дрозофил лучше в 3–5-литровых банках, закрытых полиэтиленовой крышкой с двумя отверстиями. Одно отверстие надо закрыть марлей, в другое вставляется стеклянная трубочка, противоположный конец которой закрепляется в отверстии в стекле, которым прикрыт аквариум.

При температуре 20–24 °С первое поколение мушек из отложенных яиц появляется через 7–10 дней. Яйца мух можно собрать и хранить в холодильнике. Помещенные в банку, установленную в теплое место, они дадут новое поколение мух.

В качестве кормового субстрата для выращивания дрозофилы можно использовать порченные фрукты, особенно яблоки, груши, кусочки банана, гниющие листья капусты, сладкие каши, сваренные на воде.

Для усиления окраски мальков и взрослых рыб желательно добавлять в рацион личинок мушек, выращенных на мелко натертой моркови.

Существуют и более сложные кормовые смеси для мушек. Использование их позволяет стабильно получать более полноценных в пищевом отношении дрозофил.

Рецепт питательной среды: желатин или агар – 6 г, манная крупа – 40 г, сахар – 30 г, дрожжи – 30 г, вода – 1 л. Вначале необходимо вскипятить воду и всыпать манную крупу, сахар и варить 1 ч. Желатин замочить предварительно в холодной кипяченой воде на 3 ч. После разбухания желатин необходимо добавить в горячую смесь и затем остудить среду до температуры 30 °С. После этого добавить дрожжи. Остывшая плотная среда со временем разжижается, поэтому в сосуд помещают полоски бумаги, чтобы мушки не утонули. Перед скармливанием сосуд с мухами или пакет помещают в холодильник на 15 мин, чтобы мухи «уснули». «Уснувших» мух стряхивают в аквариум. Смесь такого состава позволяет вырастить 2–3 поколения мушек.

Контрольные вопросы

1. Какова оптимальная температура культивирования дрозофилы?
2. Что используется в качестве субстрата для выращивания мушки дрозофилы?
3. Как правильно использовать мушек в качестве корма?

Тема 6. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ИНFUЗОРИЙ НА РАЗЛИЧНЫХ СРЕДАХ

Цель занятия: овладеть методиками культивирования инфузорий на различных средах.

Материалы и оборудование: стеклянные колбы вместимостью 0,5 и 1 л, компоненты питательных сред (вода, сено, рисовая и овсяная крупы по 50 г, цельное молоко), электроплитка, марля, фольга, стеклянные пипетки, чашки Петри, микроскопы, предметные и покровные стекла, маточная культура инфузории.

Задание: 1) рассмотреть под микроскопом и зарисовать внешний вид парамецию; 2) изучить и законспектировать методику приготовления различных питательных сред для культивирования инфузорий; 3) приготовить различные питательные среды и культивировать инфузорию; 4) сравнить продуктивность инфузорий при выращивании на различных средах.

Простейшие являются первичным живым кормом для самых мелких личинок рыб. Среди простейших инфузории – довольно крупные организмы, размеры которых обычно колеблются от 0,1 до 0,3 мм. Наиболее широко в качестве живого корма используют парамецию (*Paramecium caudatum*) (рис. 4).

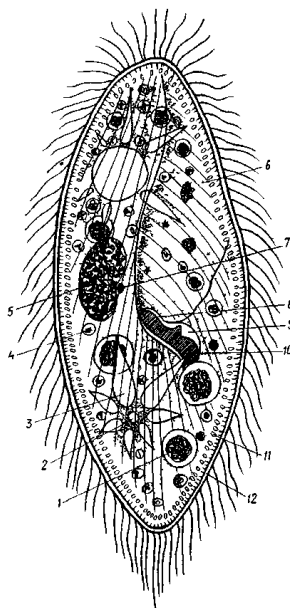


Рис. 4. Инфузория *Paramecium caudatum*:
1 – пищеварительная вакуоль; 2 – сократительная вакуоль; 3 – приводящий канал; 4 – экскреторные тельца; 5 – макронуклеус; 6 – перистом; 7 – микро-нуклеус; 8 – ротовое отверстие; 9 – глотка; 10 – ундулирующая мембрана; 11 – трихоцисты; 12 – пелликула и реснички

Ресничная инфузория является типичным представителем класса *Ciliata* типа *Protozoa*. Она сохраняет постоянно свою форму тела благодаря тому, что наружный слой цитоплазмы плотный.

Все тело инфузории покрыто продольными рядами многочисленных мелких ресничек, которые совершают волнообразные движения.

С их помощью туфелька плавает тупым концом вперед. От переднего конца до середины тела проходит желобок с более длинными ресничками. На конце желобка – ротовое отверстие, ведущее в глотку.

Питаются инфузории главным образом бактериями. Помимо бактерий инфузории могут питаться дрожжами и водорослями.

При кормлении их водорослями следует избегать прямого солнечного света, так как кислород, выделяемый только что заглоченными водорослями, может разорвать инфузорию.

Также следует избегать наличия в сосуде с инфузориями посторонних взвешенных частиц, поскольку, переполнив свое ротовое отверстие посторонней взвесью, инфузории могут погибнуть.

Размножение может осуществляться половым или вегетативным способом. При вегетативном способе размножение инфузорий происходит путем поперечного деления клеток. При половом две клетки соединяются и обмениваются частями ядерного аппарата, несущего наследственное вещество. В оптимальных условиях инфузории характеризуются очень высокой интенсивностью размножения.

Инфузории очень подвижны. За одну секунду они преодолевают расстояние, в 10–15 раз превышающее длину их тела, что надо учитывать при выкармливании мелких, малоподвижных личинок некоторых икромечущих рыб, которые даже при высокой концентрации инфузорий могут оставаться голодными.

Многие инфузории выдерживают значительное понижение температуры. При 0 °С парамеция продолжает делиться, но в замедленном темпе, деление происходит 1 раз в 18–19 дней. Также инфузории обладают способностью адаптироваться к высоким температурам. Например, парамеция живет в горячих источниках Японии при температуре 36–40 °С.

Реакция среды (рН) оказывает большое влияние на рост, размножение и питание инфузорий. Оптимальное рН для *P. caudatum* – 6, 5–7,5. Но она не погибает при рН 4,5–9,0. Инфузории устойчивы по отношению к понижению содержания растворенного в воде кислорода, оптимальное значение которого находится в пределах 6–8 мг/л.

Для разведения туфельки обычно используют цельностеклянные сосуды объемом от 3 л. Хорошие результаты достигаются при комнат-

ной температуре, но пик размножения инфузорий наблюдается при 22–26 °С. В первые дни культивирования желательна слабая продувка, но осадок не должен подниматься со дна банки. Культивируют инфузорию в колбах, делительных воронках, аппаратах Вейса, бассейнах, полиэтиленовых садках и др.

В качестве корма для инфузорий можно использовать высушенные корки банана, тыквы, дыни, желтой брюквы, нарезанную кусочками морковь, гранулы рыбьего комбикорма, молоко, высушенные листья салата, кусочки печени, дрожжи, сенной настой и водоросли, т. е. те субстанции, которые или непосредственно потребляются тифельками (дрожжи, водоросли), или являются субстратом для развития бактерий.

При приготовлении сенного настоя возможны различные варианты соотношений сена и воды. При лабораторном культивировании берут 20 г сена и 1 л воды. При массовом культивировании лучшие результаты получены при концентрации 1–2 г/л, так как при более высоких концентрациях сенного настоя культура загнивает и на поверхности образуется бактериальная пленка.

В лабораторных условиях для приготовления сенного настоя берут 10–20 г сена, помещают в 1 л воды, кипятят в течение 20 мин, затем фильтруют и настаивают 2–3 дня. Через 2–3 дня из спор развиваются сенные палочки, служащие пищей для инфузорий. Настой хранят в прохладном месте и по мере необходимости добавляют в культуру.

Листья салата, кусочки печени помещают в мешочек с марлей, опускают в воду и настаивают в течение нескольких дней, а затем вносят зарядку инфузорий.

Кожуру спелых, неповрежденных бананов, дыни, брюквы, тыквы высушивают и хранят в сухом месте. Перед внесением в культуру берут кусочек размером 1–3 см², ополаскивают и заливают 1 л воды. Гидролизные дрожжи вносят из расчета 1 г на 100 л.

Для приготовления отвара овсяной, рисовой, пшенной и других круп берут 50 г крупы, помещают в 1 л воды и кипятят в течение 15–30 мин. Отвар сливают в чистую посуду и закрывают.

Наиболее простым способом является разведение тифелек на снятом, кипяченом или сгущенном без сахара молоке. Молоко вносят в культуру из расчета 1–2 капли (1,5–2 мл) на 1 л воды. Инфузории используют молочнокислых бактерий.

Перед кормлением инфузорий очищают, чтобы не испортить воду в аквариуме. Существует несколько способов очистки.

1. Настой с инфузориями пропустить через фильтровальную бумагу, после чего бумагу опустить в аквариум.

2. Выдержать инфузорий, взятых из культиватора, в воде в течение 1–2 суток. За это время они уничтожат всех бактерий, попавших вместе с ними.

Основным правилом при выращивании инфузорий является то, что нельзя допускать передозировки в питании. Также необходимо знать, что инфузории, выращенные на бактериях обладают положительным фототаксисом, т. е. стремятся к свету, а выращенные на водорослях – отрицательным фототаксисом, стремятся в темноту. Это свойство можно использовать при выращивании тенелюбивых личинок рыб. Инфузорий можно выращивать на водорослевой суспензии сценедесмуса и хлореллы. В практике лабораторного и массового культивирования помимо *P. caudatum* обычно используют следующие высокопродуктивные виды: *P. aurelia*, *P. bursaria*, *Tetrachymena pyriformis*.

Контрольные вопросы

1. Краткая характеристика инфузорий.
2. Отношение инфузорий к факторам среды.
3. Какие устройства применяют для культивирования инфузорий?
4. Какие питательные среды используются для выращивания инфузорий?
5. Как готовится сенной настой в лабораторных и промышленных условиях?
6. Как правильно приготовить молочный и сенной настой?
7. Чем питается инфузория?

Тема 7. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ДАФНИЙ НА РАЗЛИЧНЫХ СРЕДАХ

Цель занятия: овладеть методикой культивирования дафний.

Материалы и оборудование: емкости для культивирования, дрожжи, маточная культура дафний, вода, водорослевая суспензия, плакаты, рисунки.

Задание: 1) изучить и законспектировать методы культивирования дафний; 2) приготовить питательную среду на гидролизатных дрожжах, внести культуру дафний; 3) изучить и зарисовать системы культивирования ветвистоусых рачков; 4) рассмотреть и зарисовать садки для культивирования дафний.

Для массового получения живого корма особое значение имеют представители отряда *Cladocera* – ветвистоусые ракообразные.

Из большого количества видов этого отряда в практике культивирования используют лишь дафниид – *Daphnia magna*, *Moina macrocopa*, *Moina restirostris*.

Размножаются ветвистоусые рачки половым путем и партеногенетически. Оптимальная температура для культивирования *D. magna* 18–22 °С, *Moina macrocopa* – 24–26 °С, *Moina restirostris* 24–28 °С.

Оптимальное значение содержания в воде кислорода для всех культивируемых ракообразных составляет 6–8 мг/л, рН – в пределах 6–8.

Культивирование ветвистоусых рачков осуществляется на бактериальном корме, мелких планктонных водорослях, дрожжах. В качестве источника органического вещества для бактерий используют конский или коровий навоз, птичий помет, подвяленную растительность.

Конский или коровий навоз вносят при зарядке культуры из расчета 1,5 кг/м³ и добавляют каждые 8–10 дней по 0,75 кг/м³. Птичий помет как более концентрированное удобрение вносят по 0,5 кг/м³ при зарядке и по 0,25 кг/м³ каждые 8–10 дней. Хорошим кормом для дафний и моин в условиях массового культивирования являются протокочковые водоросли.

В связи с тем, что бактериальные среды с использованием навоза трудно поддаются управлению (очень быстро наступает ухудшение кислородного режима), поэтому неконцентрированные корма заменяют концентрированными кормовыми дрожжами. При культивировании *D. magna* в бетонных бассейнах их вносят до 20 г/м³ при зарядке культуры и 10 г/м³ при подкормке каждые пять дней. В культуру *Moina macrocopa* вносят 100 г/м³ в начале культивирования и затем каждые два дня по 50 г/м³. Дрожжи перед внесением измельчают, замачивают в воде на 3–4 ч и вносят в культуру.

Рекомендуют использовать навозные и сенные настои из жесткой растительности или кормовых дрожжей. Настои приготавливают из расчета 17,6 г свежего навоза и 84 г просеянной земли. Смесь выдерживают в течение трех дней при температуре 15–20 °С. Затем настои процеживают и разбавляют свежей прудовой водой (1 л настоя на 4 л прудовой воды). Через час помещают дафний, развитие которых длится максимум три недели. На третий день такие настои дают вспышку численности бактерий – корма для дафний. Такую же вспышку дают и настои сена (2 кг сена на 100 л воды), которые выдерживают три дня, затем выливают в водоем один раз в семь дней из расчета 4 л/м³. Созревание культуры продолжается 10–15 дней.

Культивируют культуру на гидролизных дрожжах. Дрожжи вносят

в воду из расчета 15–20 г сухой массы на 1 м³ воды с протококковыми водорослями, культуру дафний – через 1–2 дня, когда развитие дафний и фитопланктона достигает максимума. Частично дрожжи являются кормом и для дафний. Поэтому их вносят как подкормку каждые пять дней в количестве 8–10 г/м³.

Культивирование *Cladocera* на водорослевом корме осуществляют в одной и той же емкости или в разных емкостях при периодическом внесении в культуру водорослей. В процессе развития культуры периодически вносят подкормку для водорослей. Ориентировочные нормы внесения минеральных удобрений – 5 г/м³ суперфосфата и такое же количество аммиачной селитры в начале культивирования и такая же норма каждые семь дней.

Системы культивирования в зависимости от входящих в культуру и выходящих из нее компонентов разделяют на 5 основных типов: одноканальная, двухканальная, трехканальная, многоканальная и комбинированная (рис.5).

В одноканальной системе вода и корма поступают в емкость с культивируемыми животными, а оттуда вместе с водой уходят продукты метаболизма и образовавшаяся в культуре конечная продукция культивируемых животных.

В двухканальной системе вода или вода с кормом поступают в культиватор, а затем вместе с метаболитами и полезной продукцией выходят из культиватора. По второму каналу в культиватор подаются корма (тип А) или происходит сьем продукции животных (тип В).

В трехканальной системе поступление воды и выход ее с метаболитами идут по одному каналу, а подача корма и сьем продукции животных – по двум другим каналам.

В многоканальной системе вода и корма подаются в агрегат с культивируемыми животными через многочисленные каналы, и через такое же количество каналов вода вместе с метаболитами выходит наружу. Один канал служит для съема продукции.

В комбинированной системе вода или вода с кормами подается сначала по одному каналу в большой резервуар, а оттуда по многим каналам поступает в емкость с культивируемыми животными. Вода с продуктами обмена уходит из агрегата по многим каналам и затем попадает в один общий канал. По особым каналам происходит сьем продукции (тип А) или внесение корма и сьем продукции (тип В).

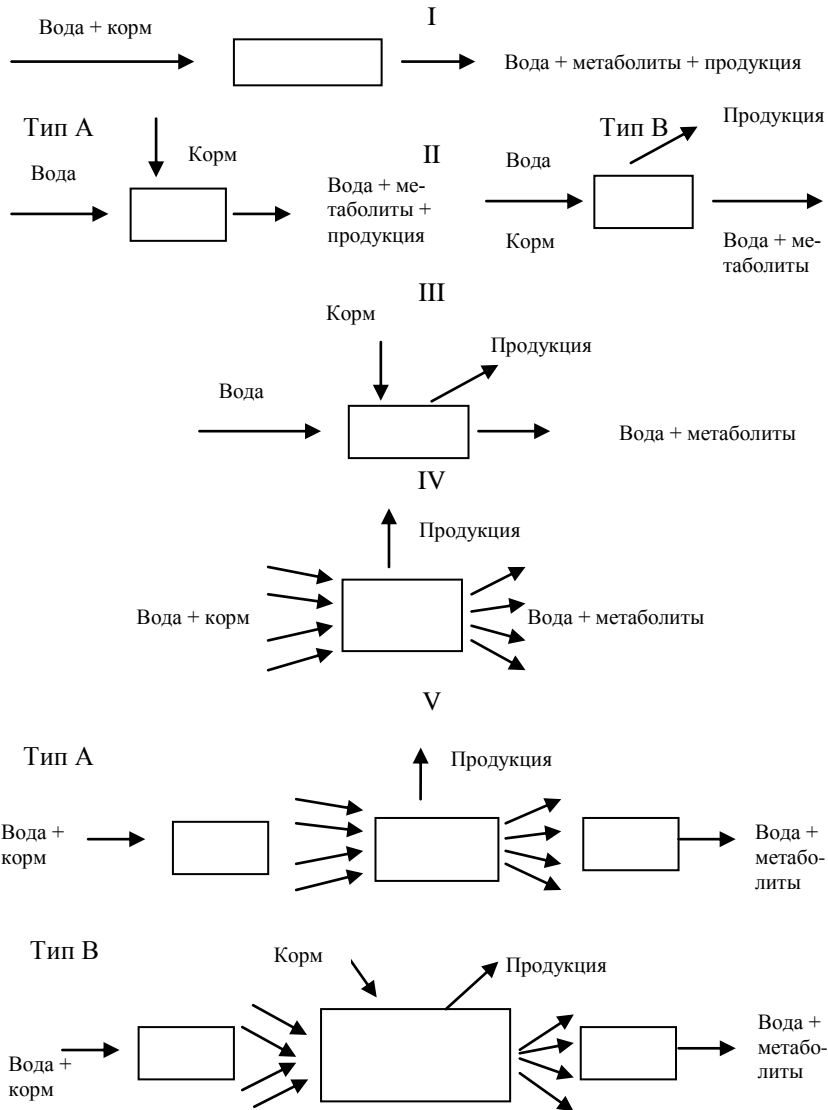


Рис. 5. Схема основных систем культивирования планктонных животных

Первые три системы применимы для замкнутых емкостей из плотного материала, не пропускающего воду. Четвертая и пятая системы культивирования рассчитаны на использование в качестве агрегатов для культивирования садков (из сита), свободно пропускающих воду, метаболиты, микроводоросли, бактерии, мелкие частицы детрита, но полностью задерживающих культивируемых животных.

Системы 1 и 2В применимы только в проточных культурах, а системы 2А и 3 как в проточных, так и в непроточных.

В многоканальной системе используют садки из сита №6 для *D. magna* и из сита № 30 и выше для *Moina macroscopa*, *Moina restirostris*. Садки могут быть открытые закрытые (рис. 6).

При культивировании в небольших масштабах удобны открытые садки цилиндрической формы.

Перед погружением закрытого садка в воду одна горловина завязывается, а через отверстие другой горловины в садок вносится зарядка животных. Садок укрепляется в горизонтальном положении веревками.

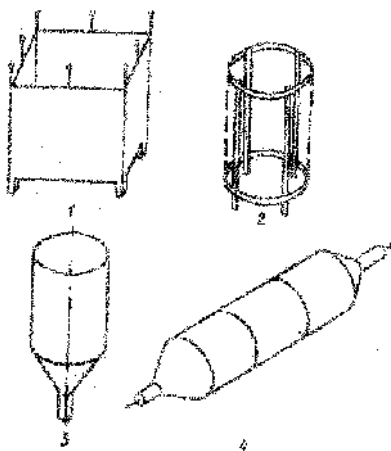


Рис. 6. Садки для культивирования ветвистоусых ракообразных:
1 – прямоугольный открытый садок из капронового сита; 2 – цилиндрический полиэтиленовый садок открытого типа; 3 – открытый конусообразный садок из капронового сита; 4 – закрытый садок из капронового сита

При больших масштабах культивирования лучше использовать прямоугольные открытые садки, которые закрепляются между мостиками.

Контрольные вопросы

1. Какова оптимальная температура культивирования дафний?

2. Что является кормом для дафний?
3. Как правильно культивировать дафний и мойн на конском, коровьем навозе и птичьим помете?
4. Как готовят сенной настой для культивирования дафний?
5. Как выращивают дафний на водорослевом корме?
6. По какому принципу и на какие типы делят системы культивирования дафний?
7. Какие садки используют для культивирования дафний?

Тема 8. КОЛОВРАТКИ – СТАРТОВЫЙ КОРМ ДЛЯ РЫБ

Цель работы: изучить методику культивирования коловраток.

Материалы и оборудование: рисунки, плакаты, культура коловраток, стеклянные емкости на 1 л, микроскопы, предметное и покровное стекла, стеклянные палочки-лопаточки, мерная кружка, дрожжи, культура микроводорослей.

Задание: 1) законспектировать, пользуясь методическими указаниями и рекомендуемой литературой, состав питательных сред для культивирования коловраток и методику их приготовления; 2) приготовить питательную среду для культивирования коловраток.

По систематическому положению коловратки относятся к низшим червям, классу Коловратки (*Rotatoria*) типа первично-полосатых червей (*Nemathelminthes*). Это самые мелкие из многоклеточных организмов. Размеры их колеблются от 0,04 до 2 мм. Коловраток можно сразу отличить от других животных по наличию коловращательного аппарата и жевательной глотке, так называемому «мастаксу». Коловращательный аппарат представляет собой совокупность различно расположенных на переднем конце тела ресничек, которые у отдельных видов располагаются по краям дисковидных выростов головы, и своим блеением напоминают мерцание спиц быстро вращающегося колеса, вызывают коловращение, за что и получили свое название.

Коловратки населяют не только разнообразные пресные, солоноватые и соленые бассейны как с очень высокой, так и с очень низкой температурой воды. Многие из них приспособились к существованию в местах, где вода бывает в ничтожном количестве или только временно: в прибрежном песке водоемов, во мху, в лесной подстилке, в дуплах деревьев, в почве. Но основная масса коловраток населяет пресные водоемы.

Относительно небольшие размеры, наличие значительного количества (от 30 % белка) низкомолекулярных пептидов и свободных аминокислот, делающих их легкоусвояемыми для личинок рыб на ранних стадиях развития, лабильный химический состав, изменение которого происходит в течение нескольких часов в зависимости от качества корма, и возможность направленного формирования его состава, соответствующего потребностям гидробионтов, питающихся коловратками, – все это открывает большие возможности использования коловраток в качестве стартовых живых кормов для личинок многих видов рыб и некоторых беспозвоночных.

Наиболее перспективными в качестве корма считаются солоноводная коловратка *Brachionus plicatilis*, пресноводная *Br. rubens*, *Br. calyciflorus*, *Philodina acutiformes odiosa*, *Asplanchna priodonta*.

Brachionus plicatilis – типично планктонная коловратка, встречающаяся как в континентальных, так и в морских прибрежных водоемах. Она эвригамна и эвритермна. Излюбленной пищей коловраток является фитопланктон, но при его отсутствии они могут использовать другие виды корма, например дрожжи.

Коловратки *p. Brachionus* обладают гетерогонией, т. е. чередованием полового и партеногенетического способа размножения (преобладает партеногения). Размножение осуществляется самками двух типов: миктическими и амиктическими, которых можно различить между собой в культуре лишь по наличию определенного типа яиц. Миктические яйца по объему в 2–3 раза мельче, чем амиктические, зато их образуется гораздо больше.

Коловраток культивируют в емкостях на 3–100 л, добываясь их плотности в 100–300 экз/мл. Желательны очень слабая продувка и боковое освещение. Температура культивирования – комнатная, однако коловратки могут существовать при температуре от 15 до 35 °С, но оптимум приходится на 26–28 °С. Культивируются при любой освещенности, но лучше если продолжительность освещения составляет 8 ч в сутки. Наиболее оптимальная реакция среды (рН) составляет 7,1–7,6 (возможно до 9,5). Соленость выдерживают от 1 до 90 ‰, но лучше 3–25 ‰. При культивировании в среде с соленостью до 6 ‰ в культуре коловраток появляются инфузории. Обычно коловраток культивируют при солености 25 ‰: это 1 столовая ложка NaCl на 1 л воды или 83 мл насыщенного раствора NaCl (300 ‰) на 1 л воды. Хорошие результаты культивирования можно получить при замене $\frac{1}{3}$ – $\frac{1}{4}$ коловраток с водой на свежую воду такого же объема (83 мл насыщенного

раствора NaCl на 1 л культуры сценедесмуса). Добавка водорослей повышает кормовые качества коловраток и ускоряет темпы их размножения и откладывания яиц. Размер пищевых частиц для коловраток не должен превышать 12–15 мкм (размер хлореллы – 3–4 мкм, клеток пекарских дрожжей – 6 мкм). Норма кормления – 40 мг на 1 л сухой биомассы. Высокую численность коловраток можно получить при внесении дрожжей в количестве от 100 мг/л до 1 г/л. Кормят коловраток пекарскими или сухими кормовыми дрожжами. Спиртовые дрожжи необходимо заморозить: тонко порезать и хранить в морозильной камере до приобретения ими коричневого цвета. Использование свежих спиртовых дрожжей вызывает гибель коловраток, покоричневевших – размножение.

Для получения покоящихся яиц коловратку перестают кормить и снижают температуру до 12–14 °С, при этом убирают освещение. Культуру сливают, осадок на дне культиватора отфильтровывают через бумажный фильтр, высушивают в темноте на воздухе и хранят вместе с фильтром. Перед инкубацией яйца промораживают 1–2 месяца, выдерживая их при температуре минус 5–10 °С, однако можно и не промораживать. Яйца для инкубации помещают в соленую воду (25 %) в количестве 1 г/л. Затем температуру повышают до оптимальной (28 °С) и обеспечивают слабую продувку воздухом. Выклев из яиц происходит через 36–48 ч. Пустые оболочки всплывают, развивающиеся яйца тонут. Коловратку сразу кормят хлореллой или пекарскими дрожжами, внося корм до начала инкубации.

Для отбора половозрелых коловраток используют газ № 64, для тотального отбора – № 76. Солоноводную коловратку для кормления пресноводных рыб необходимо распреснять до 3 % в течение 12–24 ч путем добавления по каплям 800 мл аквариумной воды.

Пресноводные коловратки (*Br. rubens*, *Br. caluciflorus*) по внешнему виду напоминают солоноватоводную *Br. plicatilis*. Однако размеры их несколько меньше. Созревают пресноводные коловратки при оптимальной температуре инкубации (22–32 °С) за сутки. Продолжительность жизни – 4–17 дней. Самка дает от 3 до 12 яиц каждые 12 ч при партеногенетическом развитии или 2 покоящихся яйца. При оптимальных условиях культивирования и партеногенетическом размножении можно получать до 217 г/м³ коловраток в сутки.

Для постоянного культивирования коловраток используется следующий способ. В стеклянную емкость помещают пресноводную культуру водорослей вместе с илом, состоящим из погибших клеток

водорослей, и в нее вносят культуру коловраток. Под емкостью и над ней располагают лампы. При слабом освещении снизу коловратки благодаря положительному фототаксису опускаются вниз и питаются бактериями, размножающимися в илу на погибших клетках фитопланктона. Проникающий сквозь ил свет способствует насыщению содержимого емкости кислородом благодаря фотосинтезу фитопланктона, находящегося в сосуде. При массовом размножении коловраток концентрация кислорода в емкости падает, и коловратки поднимаются к поверхности. Это указывает на то, что необходимо разрядить культуру коловраток. Для концентрирования коловраток у поверхности воды отключают нижний свет и включают верхний. Сконцентрированных у поверхности коловраток сливают сифоном и скармливают личинкам рыб, а в культиватор при необходимости доливают свежий фитопланктон. Благодаря верхнему свету происходит размножение фитопланктона, насыщение воды кислородом в процессе фотосинтеза водорослей и, как следствие этого, распределение оставшихся коловраток по толще воды. Далее верхний свет отключают и включают нижний, и весь процесс повторяется.

Культивирование пресноводных коловраток сопряжено с большими сложностями из-за засорения культуры инфузориями и другими организмами, яйца которых заносятся с пылью.

Кормление личинок рыб пресноводными коловратками более желательно по сравнению с солоноводными, поскольку пресноводные коловратки не гибнут в пресной воде, обеспечивая постоянное и равномерное кормление личинок. Кроме того, они очищают аквариум с личинками от бактерий.

Пресноводная коловратка *Philodina acuticornis odiosa* по размерам крупнее, чем представители рода *Brachionus*.

Филодины обычно обитают среди иловых частиц на дне аквариумов или пресноводных водоемов. Их легко обнаружить под микроскопом или бинокляром, если рассматривать донный ил. Они обычно медленно переползают или не очень быстро плавают от одной иловой частицы к другой в поисках пищи. По форме они напоминают вытянутый конус, на расширенной передней части которого находится коловращательный аппарат, а на заднем заостренном конце, так называемой ноге, имеются два пальца – «хватательная вилка».

Питаются филодины водорослями и бактериями. Добавка в культуру дрожжей угнетает их рост. Средняя продолжительность жизни рав-

на 27 суткам, среднее число яиц на одну самку – около 50. Культивируют их обычно при температуре 24–27 °С.

Обычно их содержат в стеклянном сосуде с отстоянной водопроводной водой. В качестве корма используют сенную палочку и молочнокислых бактерий. Для их разведения необходимо вскипятить 10 г сена в 1 л дистиллированной воды. Дать настояться три дня, затем процедить и добавить (на 1 л настоя) 2 л азрированной дистиллированной воды. Для поддержания культуры в нее достаточно добавлять по 1–2 капли кипяченого молока 2–3 раза в месяц. Голодные коловратки обычно опускаются на дно и держатся среди частиц ила или сидят на стенках банки. Сытые коловратки плавают в толще воды.

При внесении их к личинкам рыб филодины хорошо растут и размножаются на фекалиях личинок, а также на погибших в пресной воде солоноводных коловратках. Их можно культивировать совместно с инфузорией туфелькой на банановых корках с добавлением в культуру молока.

Недостатком филодин, используемых для выкармливания личинок рыб, является их способность закапываться в ил.

Asplanchna priodonta – это одна из наиболее крупных (0,28–1,5 мм) пресноводных коловраток. Взрослая аспланхна является хищником. Она питается инфузориями и более мелкими коловратками. Эти типично планктонные животные всю жизнь проводят в толще воды, находясь в непрерывном движении. Плавают они ротовым отверстием вперед, не вращаясь вокруг своей оси, как другие коловратки.

Тело аспланхны прозрачное, почти круглое. На передней части размещен коловращательный аппарат, имеющий форму оборки. Ноги у них нет.

Asplanchna priodonta хорошо разводится в пресной воде при комнатной температуре с кормлением ее инфузориями или мелкими коловратками, например, рода *Brachionus*. Можно выращивать аспланхн и на солоноводных коловратках. Для этого культуру солоноводных коловраток медленно распресняют до солёности в 3 ‰, куда затем и вносят аспланхн.

Аспланхн обычно используют при выкармливании молоди рыб в качестве добавки к основному корму при переходе с более мелких кормов к более крупным. Питательность аспланхн сравнительно низка, поэтому перед скармливанием аспланхн молоди рыб их самих желательно покормить.

Оптимальный способ выращивания полноценных в пищевом отношении аспланхн следующий. На 1 л культуры водоросли сценедесмуса или хлореллы вносится 10 мл насыщенного раствора NaCl и немного пекарских дрожжей. Далее туда же вносятся распресненные до 3 % и отцеженные через газ № 76 солоноводные коловратки и культура аспланхн.

Полученную культуру выдерживают при боковом освещении люминесцентной лампы. Молодь аспланхны растет на дрожжах, крупные особи питаются солоноводной коловраткой, содержащей в кишечнике водоросли и дрожжи.

Контрольные вопросы

1. Назовите виды солоноводных и пресноводных коловраток.
2. Какими способами размножаются коловратки?
3. Дайте общую характеристику солоноводной коловратки.
4. Каковы оптимальные условия культивирования коловратки *Brachionus plicatilis*?
5. Какой корм вызывает гибель коловратки *Brachionus plicatilis*?
6. Что является кормом для пресноводных коловраток *Br. rubens*, *Br. calyciflorus*?
7. Назовите основной способ культивирования пресноводных коловраток *Br. rubens*, *Br. calyciflorus*.
8. Дайте характеристику коловратки *Philodina acuticornis odiosa*.
9. Чем питается филодина?
10. Каков оптимальный способ выращивания полноценных в пищевом отношении аспланхн?

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Рекомендуемая литература	3
Тема 1. Технология культивирования хлореллы	4
Тема 2. Определение биомассы и урожайности хлореллы	11
Тема 3. Получение науплиусов <i>Artemia salina</i> путем инкубации яиц	13
Тема 4. Способы и устройства для инкубации яиц артемии салина	17
Тема 5. Культивирование дрозофилы	20
Тема 6. Культивирование инфузорий на различных средах	21
Тема 7. Культивирование дафний на различных средах	25
Тема 8. Коловратки – стартовый корм для рыб	30