

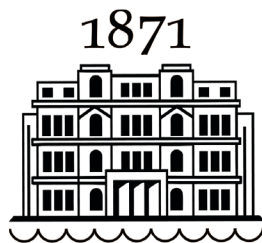
А. В. Пиркова, Л. В. Ладыгина, В. И. Холодов

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ  
И БИОТЕХНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ  
ОРГАНИЗАЦИИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ  
УСТРИЧНОГО ПИТОМНИКА  
НА ЧЁРНОМ МОРЕ**



Севастополь, 2020

*К 150-летию  
Института биологии южных морей  
имени А. О. Ковалевского РАН*



Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского  
Российской академии наук  
2020

Federal Research Center  
A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas  
of Russian Academy of Sciences

Pirkova A. V., Ladygina L. V., Kholodov V. I.

**Biological and Biotechnical Aspects  
of Organization and Functioning  
of the Oyster Hatchery in the Black Sea**

Sevastopol  
2020

Федеральный исследовательский центр  
«Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского  
Российской академии наук»

Пиркова А. В., Ладыгина Л. В., Холодов В. И.

**Биологические и биотехнические аспекты  
организации и функционирования  
устричного питомника на Чёрном море**

Севастополь

2020

*Рецензенты:*

**Раков Владимир Александрович**, д-р биол. наук, гл. науч. сотр.,  
Тихоокеанский океанологический институт им. В. И. Ильичева ДВО РАН,  
**Сухотин Алексей Александрович**, канд. биол. наук, гл. науч. сотр.,  
заведующий Беломорской биостанцией Зоологического института РАН.

**Пиркова А. В., Ладыгина Л. В., Холодов В. И.**  
П 33 Биологические и биотехнические аспекты организации и функционирования устричного питомника на Чёрном море / Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН. – Севастополь : ФИЦ ИнБЮМ, 2020. – 120 с. ; 55 ил., 11 табл., библиогр.: 41 назв.  
ISBN 978-5-6044865-3-5; DOI: 10.21072/978-5-6044865-3-5

В данном руководстве объединён опыт, приобретённый авторами в процессе выращивания гигантской устрицы в экспериментальном питомнике ФИЦ ИнБЮМ, и зарубежный опыт, описанный в литературных источниках. Руководство даёт возможность овладеть знаниями биологии вида для управления различными этапами производственного цикла. Положения руководства могут быть использованы при выращивании личинок и спата устриц как в экспериментальных питомниках, так и в коммерческих. В руководство включено обсуждение выбора подходящего места для размещения питомника и представлены расчёты необходимых площадей, объёмов морской и пресной воды, объёмов и концентраций микроводорослей и требуемого оборудования для получения 5 млн экз. спата за нерест. Дано описание биологии развития гигантской устрицы и разных видов микроводорослей, применяемых в качестве корма для производителей, личинок и спата. Представлены достижения в области селекции по коммерчески ценным признакам устриц, таким как рост, выживаемость и устойчивость к болезням, которые могут повысить надёжность и экономическую целесообразность работы питомника, а также описаны генетические манипуляции с плоидностью для получения тетраплоидных и триплоидных устриц.

Рекомендуется для научных сотрудников – биологов и биотехнологов, преподавателей ВУЗов, студентов биологических специальностей, специалистов по аквакультуре, инженеров.

УДК 639.(262.5)  
ББК 47.2+28.693(922.8)

**Pirkova A. V., Ladygina L. V., Kholodov V. I.**

Biological and Biotechnical Aspects of Organization and Functioning of the Oyster Hatchery in the Black Sea / A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas. – Sevastopol : IBSS, 2020. – 120 p.; 55 il., 11 tabl., bibliogr.: 41 items.  
ISBN 978-5-6044865-3-5; DOI: 10.21072/ 978-5-6044865-3-5

This guide encompasses the experience gained by the authors when cultivating the Pacific oyster in the experimental hatchery of IBSS and the international experience described in literature. The functioning of oyster hatcheries is based on the knowledge of the species biology. The guide provides an opportunity to acquire knowledge for managing different stages of the production cycle. Therefore, it can be useful for rearing oyster larvae and spat in both experimental and commercial hatcheries. The guide includes a discussion of choosing the right place for the hatchery and the calculations of the required space, sea- and freshwater volumes, amounts and concentrations of microalgae and the necessary equipment for obtaining 5 million specimens of spat during the spawning. A description of the developmental biology of the Pacific oyster and different microalgae species used as feed for producers, larvae, and spat is given. Breeding achievements are presented in the selection of commercially valuable traits of oyster, such as enhanced growth, survival, and disease resistance, which can increase reliability and economic viability of the hatchery in the near future. Genetic manipulations with ploidy for producing tetraploid and triploid oysters are described.

The book is recommended for researchers – biologists and biotechnologists, university teachers, biological science students, aquaculture specialists, and engineers.

Утверждено к печати учёным советом  
ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН» (протокол № 10 от 21.09.2020).

## ВВЕДЕНИЕ

В последние годы возрос интерес к выращиванию гигантской устрицы *Crassostrea gigas* в Чёрном море. В настоящее время на черноморском побережье России функционируют три десятка аквахозяйств, среди которых большинство используют технологию полуциклического выращивания гигантской устрицы, для этого они закупают спат в европейских странах либо на Дальнем Востоке. В связи с этим возникают проблемы с длительностью транспортировки спата от зарубежных устричных питомников к месту подращивания в Чёрном море, необходимостью прохождения таможни при пересечении границы и адаптации моллюсков к гидрологическим условиям моря, связанных с пониженной солёностью воды, что сказывается в дальнейшем на уровне их выживаемости и, следовательно, потери части спата. При закупке спата, осевшего в природных условиях, например в Японском море, существует угроза переноса сопутствующих видов, что приводит к интродукции и их распространению, как, например, это произошло с полихетой *Polydora websteri*, перфорирующей створки устриц, вследствие чего снижается товарное качество моллюсков [Лисицкая, Щуров, 2020].

Насущной необходимостью стала организация на Чёрном море устричного питомника, который не только позволит обеспечить посадочным материалом местные марихозяйства, но и продлить период нереста на несколько месяцев и поставлять спат в разные сезоны года. Появится возможность проведения селекционных работ и получения триплоидного спата.

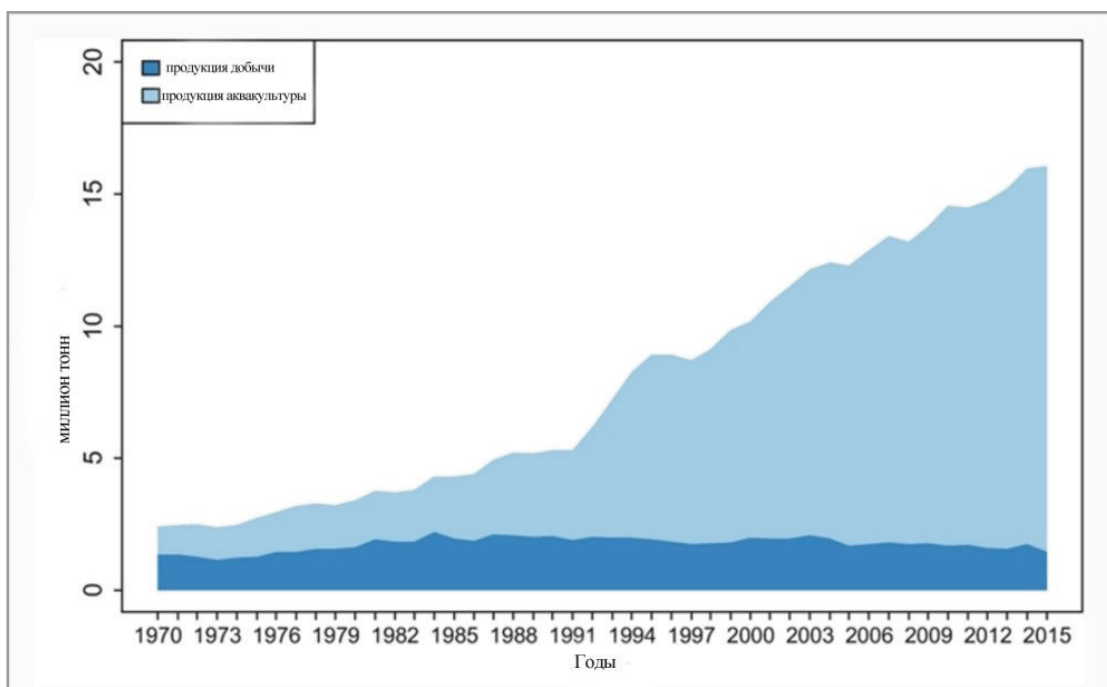
Первые питомники получения спата двустворчатых моллюсков были построены в США и в Канаде в 60-х гг. XX столетия [Helm et al., 2004]. В Европе первый питомник (SATMAR) был создан франко-американским обществом в 1972 г. на северном побережье Франции вблизи города Шербург (Cherbourg) [Buestel et al., 2009]. В последующий период был создан ряд питомников на побережье Франции и в других европейских странах.

В данном руководстве, в качестве примера, предлагается расчёт питомника производительностью 5 млн экз. спата за один нерест. Питомник может функционировать круглогодично, для чего предусмотрена система кондиционирования производителей и проведение искусственного нереста. Основная цель данного руководства – помочь овладеть знаниями технологии получения жизнестойкой молоди устриц (спата) и выращивания кормовых микроводорослей, а также предложить последовательность расчёта основных параметров устричного питомника требуемой производительности.

*Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме: «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса» (№ гос. регистрации АААА-А18-118021350003-6).*

## Глава 1. МИРОВАЯ КОНХИОКУЛЬТУРА

Двустворчатые моллюски (устрицы, мидии, морские гребешки) в настоящее время – это значительная часть мировой продукции морской аквакультуры. По сравнению с 1970 г., когда объём добытых моллюсков только незначительно превышал выращенных (1,4 и 1,2 млн т соответственно), к 2015 г. тенденция поменялась на противоположную. Мировая продукция двустворчатых моллюсков в это время составила 14,8 млн т, что более чем в 10 раз превысило добытую [Wijsman et al., 2018] (рис. 1).



**Рисунок 1.** Динамика общего мирового производства морских двустворчатых моллюсков в результате добычи и аквакультуры [Wijsman et al., 2018]

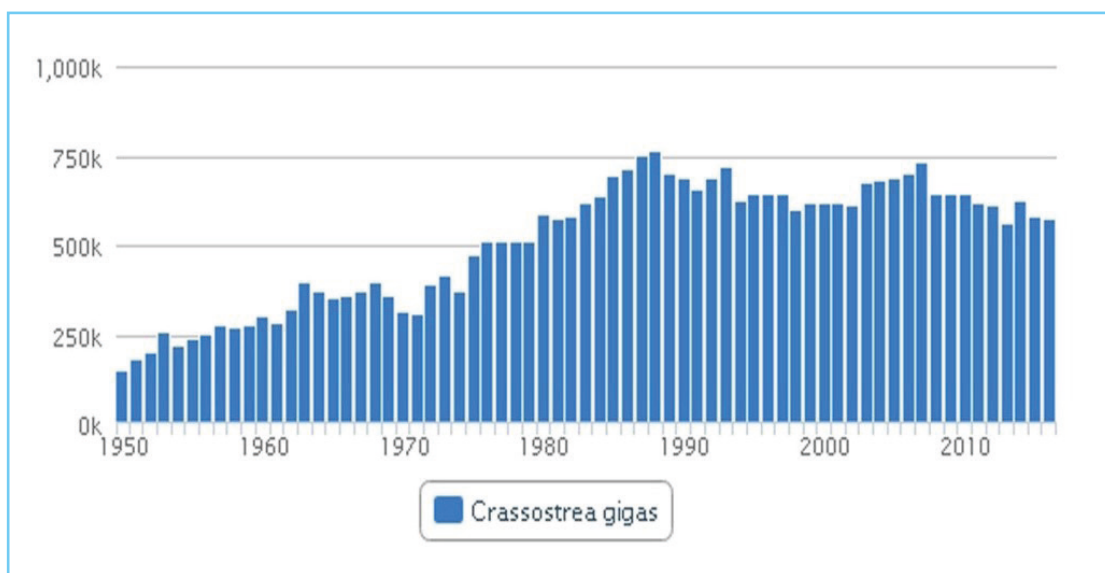
По данным ФАО (2016, стр. 23) в 2014 г мировое производство моллюсков составило 16113,2 тыс. тонн стоимостью 19 млрд. долл. США. Китай в 2014 году вырастил порядка 12 млн тонн двустворчатых моллюсков. К числу других крупных азиатских производителей двустворчатых моллюсков относятся Япония (377 тыс. тонн), Республика Корея (347 тыс. тонн) и Таиланд (210 тыс. тонн). В Европе в 2014 году вырастили 632 тыс. тонн двустворчатых моллюсков. Основными производителями были Испания (223 тыс. тонн), Франция (155 тыс. тонн) и Италия (111 тыс. тонн).

В 2010 году вся продукция аквакультуры Российской Федерации, включая рыбную, составила 120 384 т или 4,77% мировой [ФАО, 2012].

А в 2016 г производство аквакультуры рыбы в России увеличилось до 173 тыс. тонн [FAO, 2018, табл. 22]. Такой подъём произошёл за счёт аквакультуры карповых (карпа, толстолобика, белого амура). Морская конхиокультура в России по-прежнему не развита.

Благодаря растущему производству моллюсков и относительному снижению цен на них, ежегодное потребление на душу населения существенно выросло: с 0,8 кг в 1961 г. до 3,1 кг – в 2013 г. [FAO, 2016]. Морские двустворчатые моллюски ценятся потребителями не только за превосходные вкусовые качества, но и благодаря своей питательной ценности. Это полезные источники энергии и белка, богатые витаминами (А и D) и необходимыми химическими элементами (йод, селен, кальций); содержат незначительное количество жиров и в то же время являются источником омега-3 жирных кислот, необходимых для жизнедеятельности [EFSA, 2014].

Значительная часть мирового производства морских моллюсков, особенно в Европе и в Америке, приходится на долю тихоокеанской (гигантской) устрицы *Crassostrea gigas*, благодаря её быстрому росту, адаптации к различным условиям солёности и температуры и получению улучшенных линий при разведении в питомниках. Мировое производство гигантской устрицы представлено на рис. 2.



**Рисунок 2.** Мировое производство гигантской устрицы (тыс. тонн) [FAO, 2018]

В европейских странах спат закупают в питомниках, либо собирают в море на субстраты (коллекторы) в период размножения устриц природных популяций. Из-за уменьшения природных ресурсов и экологических проблем при сборе спата в природных условиях по причине растянутости периода размножения, что связано с ежегодно меняющимися температурными и трофическими условиями обитания популяций устриц, ежегодный



источник спата не может быть гарантирован и, следовательно, всё больше молодежи устриц производится в питомниках [Helm et al., 2004]. В Америке (США и Канада) спат получают исключительно в питомниках.

В Чёрное море гигантская устрица была интродуцирована в начале 80-х гг. XX столетия взамен исчезающему виду *Ostrea edulis*. Моллюсков разного размера (преимущественно спат) доставляли из Японского моря на побережье Чёрного моря. Акклиматизация проводилась согласно государственной программе, с прохождением моллюсков через карантин с последующим расселением по многим экспериментальным марихозяйствам [Орленко, 2005].

Устрицы хорошо адаптировались к черноморским условиям, о чём можно было судить по темпу роста и выживаемости [Хребтова, Моница, 1985]. Однако продолжительное время они не образовывали природных поселений, как предполагается из-за невозможности оплодотворения в море по причине незначительных концентраций гамет. В последнее время гигантскую устрицу всё чаще обнаруживают на твёрдых субстратах (на дне) и конструкциях морских ферм.

## Глава 2.

# БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ УСТРИЦЕВОДСТВА

Выращивание устриц в питомнике – сложный биотехнологический процесс, которому обучаются в течение длительной практической работы. Навыки успешного выращивания приобретаются значительно быстрее, если специалист обладает базовыми знаниями биологии выращиваемых объектов: устриц и микроводорослей, используемых в качестве корма.

### 2.1. Биология гигантской устрицы *Crassostrea gigas*

Устричную молодь (спат) получают в процессе искусственного нереста, поэтому знания по биологии размножения устриц необходимы для понимания биотехники получения и выращивания личинок в питомнике.

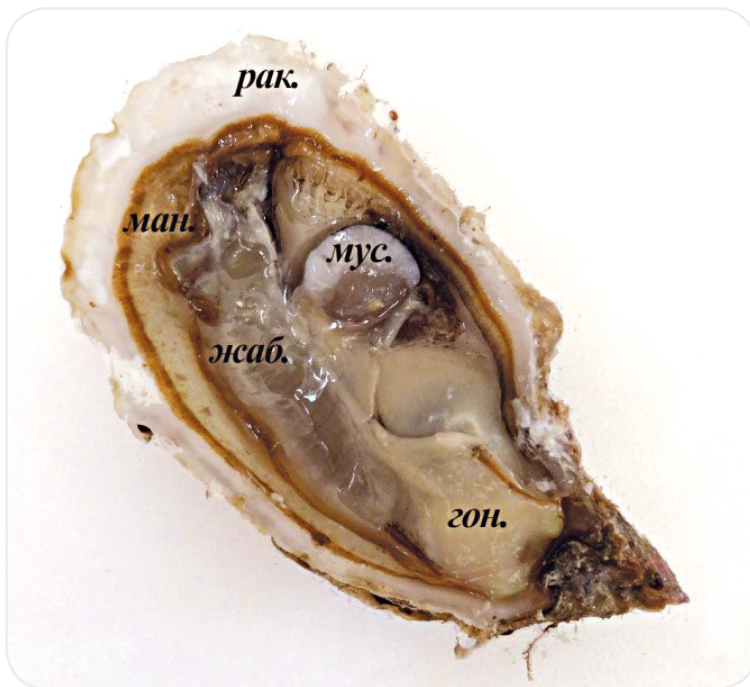
#### 2.1.1. Половое созревание и нерест гигантских устриц

У большинства двустворчатых моллюсков время наступления половой зрелости зависит от размера, а не от возраста. Устрицы питаются микроводорослями и детритом, поэтому их темп роста в основном зависит от продукции морского фитопланктона.

Темп роста моллюсков определяется температурой воды, количеством и качеством доступной пищи – биомассой и видовым составом фитопланктона.

Устрицы – раздельнополые моллюски. Половой диморфизм отсутствует, т. е. внешне самки от самцов не отличаются. Пол устриц можно определить методом исследования гонад под микроскопом в период формирования гамет (половых клеток) или же во время нереста. Тип размножения гигантской устрицы классифицируется как примитивный с внешним оплодотворением и последовательным гермафродитизмом. Это означает, что устрица может менять пол после нереста между двумя сезонами размножения. Для гигантской устрицы не выявлены факторы, определяющие реализацию пола. Однако известен следующий факт: чем старше становится гигантская устрица, тем выше вероятность, что она будет самкой. Например, в поселениях однолетних гигантских устриц самки составляют всего 30–40 %, в двухлетних – 50–60 %, а среди устриц старших возрастных групп самки составляют 80–90 % от общего количества [Холодов и др., 2017].

Гонада (орган, в котором формируются яйцеклетки или сперматозоиды) развивается вокруг пищеварительной железы (рис. 3). Зрелые гонады составляют значительную часть мягких тканей моллюска. Строение гонад у самцов и самок одинаково. Гонада покрыта оболочкой из соединительной ткани и состоит из двойной системы каналов (или ацинусов), разветвлённых с обеих сторон тела. Гаметы формируются при размножении зародышевых клеток, выстилающих стенки ацинусов. Ацинусы впадают в промежуточные каналы, а затем сливаются в один выводной канал – гонодукт. Гонодукты выстланы ресничным эпителием, в котором находятся железистые клетки, продуцирующие слизь.



**Рисунок 3.** Анатомия гигантской устрицы. Обозначения: гон. – гонада; жаб. – жабры; ман. – мантия; рак. – раковина; мус. – мускул-замыкатель

Процесс формирования яйцеклеток и сперматозоидов называется соответственно оогенезом и сперматогенезом. Годовой цикл размножения включает несколько стадий, аналогичных для обоих полов: стадия относительного покоя, начала гаметогенеза, активного гаметогенеза, преднерестовая, нерестовая стадии и стадия посленерестовой перестройки.

Стадия относительного покоя приходится на зимний период. Развивающиеся половые клетки получают питание от соединительной ткани. Весной, при благоприятных условиях, начинается гаметогенез (развитие половых клеток). Половое созревание проходит в течение лета. В конце мая и начале июня гонада максимально развита. Она окрашена в белый или кремовый цвет и занимает до 40 % объёма тела (мягких тканей). Гонада прорастает в ткани висцерального комплекса и охватывает пищеварительную систему со всех сторон. Это – преднерестовая стадия.

В заливе Петра Великого (Японское море) – места естественного обитания гигантской устрицы – период нереста протекает с июня по сентябрь. Растянность нереста объясняется сложными климатическими условиями и неустойчивым гидрологическим режимом в начале лета [Раков, 1984]. Нерест начинается при температуре воды ( $18 \pm 1$ ) °С, а пик нереста отмечен при температуре (+20...+22) °С. Одна самка может выметывать десятки миллионов яйцеклеток, что необходимо для компенсации очень высокой смертности личинок в природных условиях. Гаметы выпускаются в воду, и там же происходит оплодотворение. Запасные питательные вещества яйцеклеток представлены углеводами (гликогеном), белками и липидами.

Чтобы определить готовность устриц к нересту, используется несколько методов. Самый точный, но дорогой и отнимающий много времени – это гистологический метод. Наиболее часто применяется метод мазка гонад. Устрицу вскрывают и при помощи скальпеля надрезают гонаду; на предметном стекле делают мазок и просматривают его под микроскопом (увеличение  $\times 100$ ). На преднерестовой стадии у самцов видны малоподвижные сперматозоиды; у самок – ооциты округлой или овальной формы с ядром, оптическая плотность которого меньше, чем цитоплазмы (рис. 4).

На нерестовой стадии у самцов – подвижные сперматозоиды; у самок – большинство яйцеклеток без ядер округлой формы размерами 50–55 мкм.



**Рисунок 4.** Гонада самки гигантской устрицы на преднерестовой стадии

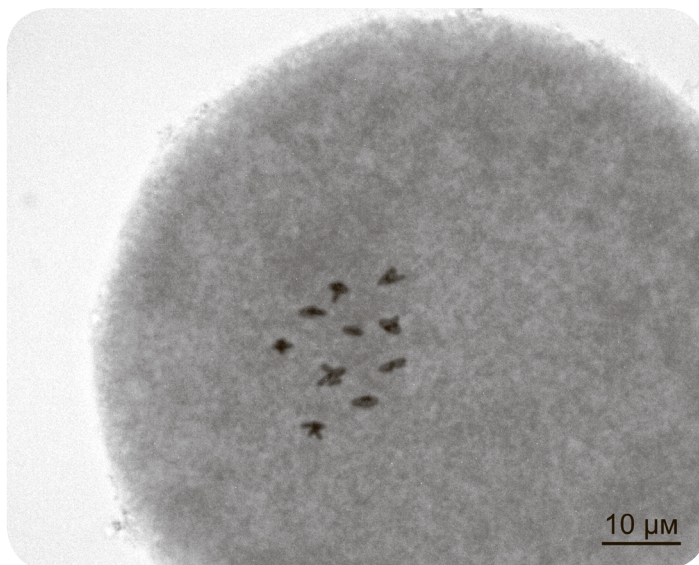
На нерестовой стадии у самцов – подвижные сперматозоиды; у самок – большинство яйцеклеток без ядер округлой формы размерами 50–55 мкм.

Нерест гигантских устриц может быть вызван несколькими факторами, включая резкие изменения температуры, химические и физические стимуляторы. Присутствие спермы в воде также может вызвать нерест.

### **2.1.2. Эмбриональное и личиночное развитие гигантской устрицы**

Вымет зрелых яйцеклеток происходит на стадиях прометафазы (наблюдается ядро) и метафазы I (без ядра) мейотического деления-созревания половых клеток. У яйцеклеток, проходящих прометафазу, ядерная оболочка вскоре исчезает. На стадии метафазы I яйцеклетки находятся в воде до оплодотворения. На метафазной пластинке – 10 бивалентов (рис. 5).

Размеры бивалентов варьируют от 2,81 до 4,38 мкм, каждый состоит из двух хромосом, тесно соединенных по всей длине ковалентными и водородными связями, а каждая хромосома состоит из двух хромонем. Диплоидное число хромосом устрицы *C. gigas* – 20.



**Рисунок 5.** Метафаза I в зрелой яйцеклетке гигантской устрицы (10 бивалентов)

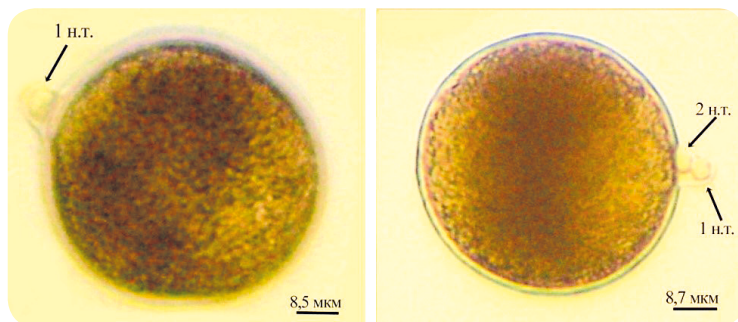
После проникновения сперматозоида в яйцеклетку процесс мейоза возобновляется. На цитологических препаратах оплодотворенных яйцеклеток окрашенное ядро сперматозоида хорошо видно в цитоплазме яйцеклетки вплоть до завершения мейоза. По окончании процесса мейоза ещё до слияния мужского и женского пронуклеусов и образования зиготы, количество хромосом уменьшается до гаплоидного числа ( $n = 10$  хромосом).

Известно, что, кроме хромосом, сперматозоид вносит в яйцеклетку и свою центриоль, которая, соединяясь с центриолью яйцеклетки, образует полюса деления. Если концентрация сперматозоидов во время оплодотворения превышает оптимальные значения, то наблюдается полиспермия (проникновение двух и более сперматозоидов), приводящая к возникновению многополюсных митотических центров. Деление хромосом при этом неравномерное и эмбрион погибает на ранних стадиях развития.

Для предотвращения полиспермии определяется оптимальное соотношение концентрации половых продуктов. При невозможности подсчёта их концентрации суспензию разбавляют в два раза морской водой через несколько минут после соединения гамет; либо при помощи мельничного сита (размеры ячеек – 40 мкм) оплодотворенные яйцеклетки промывают и переносят в профильтрованную морскую воду.

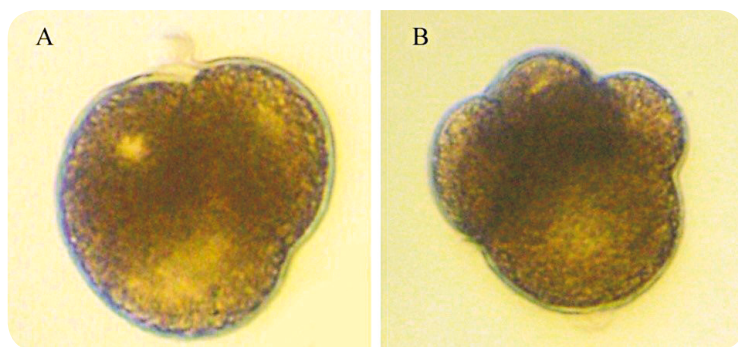
При температуре воды  $+23\text{ }^{\circ}\text{C}$  через 15 мин. после оплодотворения выделяется первое направительное тельце, а затем через 45 мин. – второе, что указывает на успешное оплодотворение яйцеклеток (рис. 6).

Через 55 мин. после оплодотворения происходит слияние женского и мужского пронуклеусов и образование зиготы.



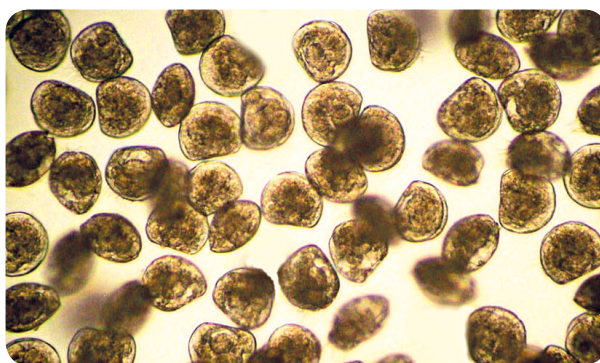
**Рисунок 6.** Выделение направительных телец у оплодотворённых яйцеклеток *Crassostrea gigas*. Обозначения: 1 н. т. – первое направительное тельце; 2 н. т. – второе направительное тельце

Первое митотическое деление зиготы наблюдается примерно через час после оплодотворения. Второе митотическое деление и образование четырёх бластомеров – через 70–80 мин. (рис. 7).



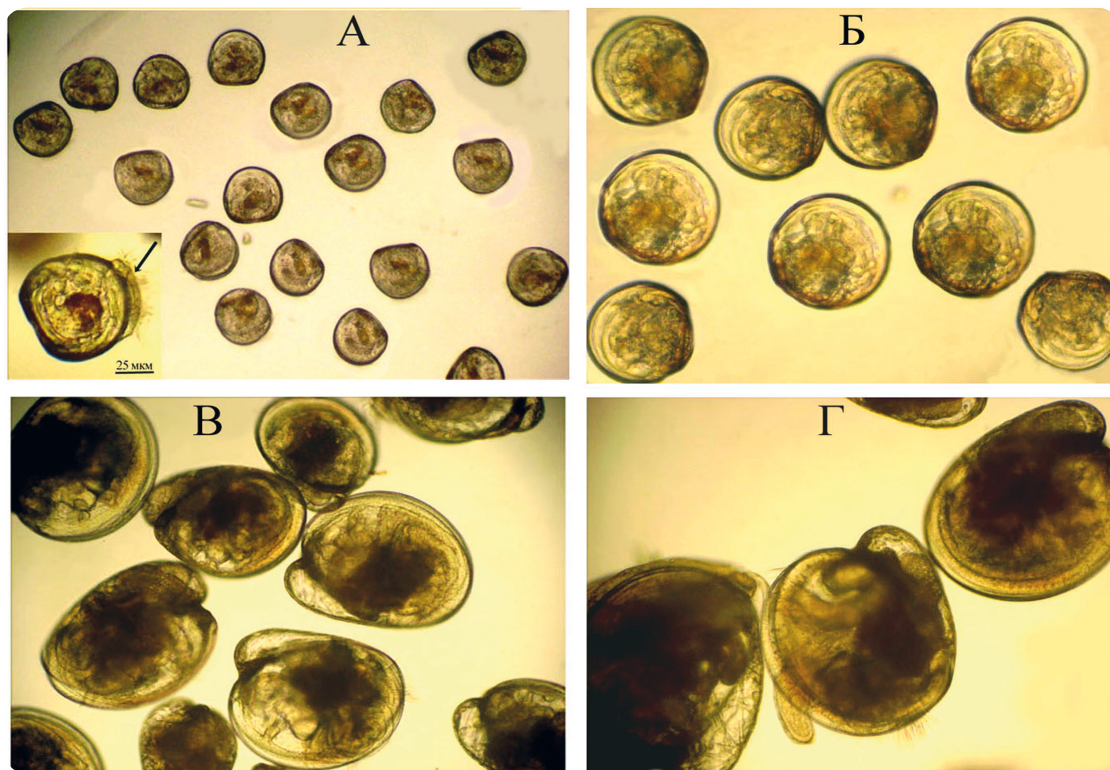
**Рисунок 7.** Двухбластомерные (А) и четырёхбластомерные (В) эмбрионы гигантской устрицы

Через сутки наблюдается первая личиночная стадия – D-велигер, или стадия продиссоконха I. Длина раковины личинок на стадии прямого замка составляет около 75 мкм (рис. 8).



**Рисунок 8.** Личинки гигантской устрицы на стадии D-велигера, возраст 1 сутки

У личинки на стадии D-велигера полностью сформированы две створки, развита пищеварительная система и велум, присущий всем личинкам двустворчатых моллюсков. Велум – это орган округлой формы, служащий для питания и плавания. Он выступает из створок при плавании и скрывается между створками, когда личинки не плавают. Внешний край велума покрыт двумя рядами ресничек (рис. 9А).



**Рисунок 9.** Личинки гигантской устрицы на разных стадиях развития: А – велигеры (возраст 3 сут.), велум обозначен стрелкой; Б – поздние велигеры (возраст 6 сут.); В – великонхи (возраст 14 сут., Н = 250 мкм); Г – педивелигеры (возраст 18 сут., Н = 385 мкм)

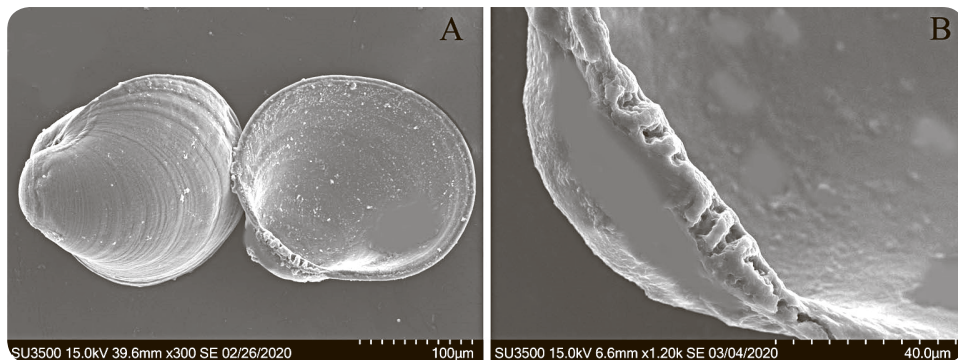
Когда личинка плавает в толще воды, кормовые микроводоросли загоняются в ротовое отверстие при помощи ресничек [Noventa, 2018]. Через трое суток размеры велигеров достигают 87,5 мкм (см. рис. 9А). В дальнейшем (возраст 6 сут.) рост в высоту раковины велигеров преобладает над ростом в длину (рис. 9Б).

Около замка образуется выпуклость, личинка переходит в стадию великонхи (продиссоконха II) (рис. 9В).

На этой стадии у личинок сильно выражена асимметрия раковины. На 15-е сутки высота раковины великонхи достигает 280 мкм, у личинок появляются «глазки» – тёмные круглые пятна, расположенные в мантии на боковых сторонах тела личинки почти в центре раковины и представляют собой пигментную чашу, выполняющую функцию линзы. В пигментную чашу вхо-

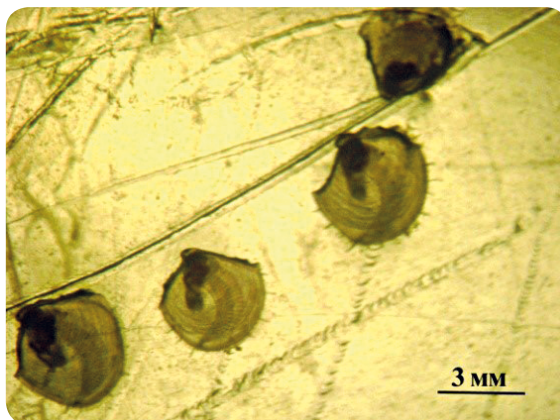
дят отростки фоторецепторных клеток, иннервируемые от церебральных ганглиев. На стадии великонхи также появляются зачатки жабр.

Кроме формы раковины, строение замкового края раковины является характерным видовым признаком личинок всех двустворчатых моллюсков [Chanley, Dinamani, 1980]. На рис. 10 представлен замковый край личинок гигантской устрицы на стадии великонхи, который может быть использован для их идентификации.



**Рисунок 10.** Раковина (А) и замковый край правой створки (А, В) личинки гигантской устрицы *Crassostrea gigas* на стадии великонхи

Примерно на 18–20-е сутки пелагической жизни, т. е. через трое суток после появления «глазка», у личинки формируется нога (см. рис. 9Г). Это стадия педивелигера. Между периодами плавания педивелигеры оседают на дно и ползают при помощи ноги. Нога участвует в поиске субстрата для прикрепления. Когда личинка находит подходящий субстрат, из педальной железы, находящейся у основания ноги, выделяется капля цементирующего вещества. Личинка переворачивается на левую створку и прикрепляется к субстрату. Оседают личинки при достижении размеров 385 мкм. После оседания начинается метаморфоз, сопровождающийся множеством изменений: исчезают нога и велум, появляются мантия и жабры. Устрица переходит в ювенильную (неполовозрелую) стадию развития (спат) (рис. 11).

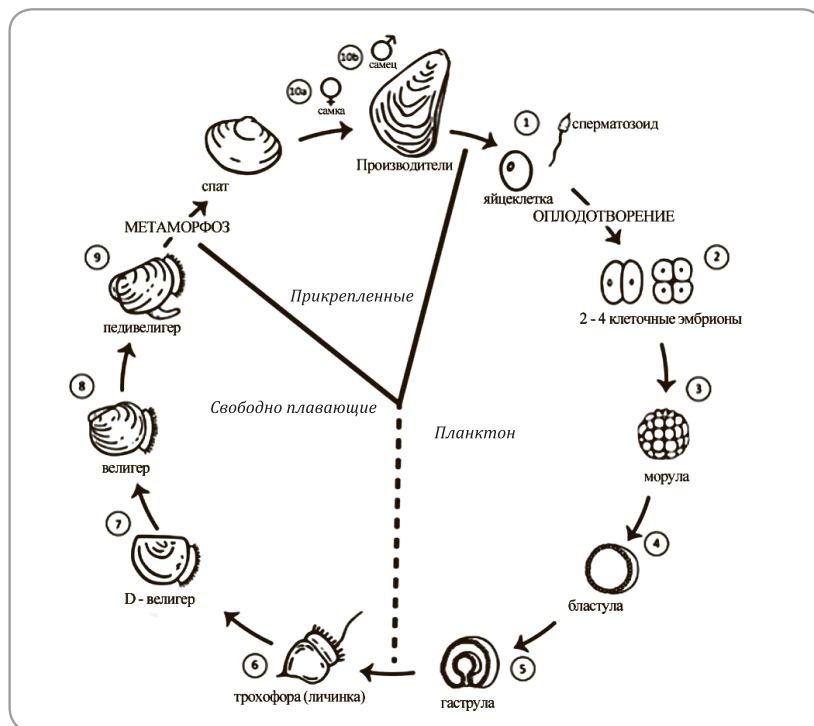


**Рисунок 11.** Спат гигантской устрицы



На ювенильной стадии при большой плотности посадки возможно вторичное прикрепление (срастание устриц в друзу) при помощи вещества, выделяемого краем мантии. В следующий год после оседания в возрасте 10–11 месяцев гигантская устрица уже готова к размножению.

На рис. 12 представлен жизненный цикл гигантской устрицы.



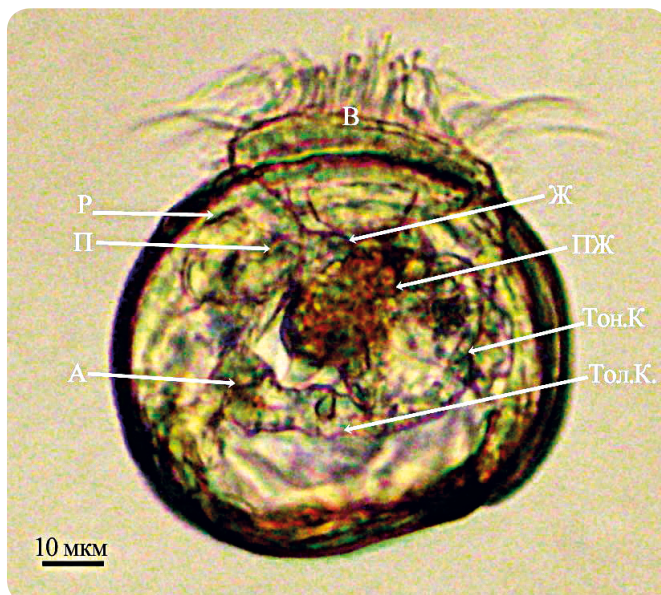
**Рисунок 12.** Схема жизненного цикла гигантской устрицы [Vogeler et al., 2016]

Таким образом, продолжительность планктонных стадий гигантской устрицы может составлять от 18 до 25 сут. и зависит от температуры воды, концентрации и видового состава микроводорослей. Происхождение маточного стада, тип скрещиваний, плотность посадки личинок и режим смены воды личинкам также являются важными факторами их роста и выживаемости.

### 2.1.3. Пищеварительная система личинок и спата гигантской устрицы

Двустворчатые моллюски являются фильтраторами и питаются главным образом фитопланктоном – микроводорослями. Фильтрация осуществляется при помощи жабр, выполняющих также функцию дыхания.

У D-велигеров ещё нет жабр. Фильтрация и сортировка микроводорослей осуществляется при помощи ресничек велума. Затем пища попадает в рот и по пищеводу направляется в желудок и пищеварительную железу, где подвергается перевариванию (рис. 13). Всасывание питательных веществ происходит в отделениях кишечника. Непереваренные частицы выделяются в виде фекалий через анус.



**Рисунок 13.** Пищеварительная система велигера гигантской устрицы: В – велум; Р – рот; П – пищевод; А – анус; Ж – желудок; ПЖ – пищеварительная железа; Тон. К – тонкий кишечник; Тол. К. – толстый кишечник

Строение пищеварительного тракта раннего велигера имеет почти все характерные для взрослых моллюсков структуры: кристаллический стебелёк в желудке, пищеварительные и секреторные клетки в пищеварительной железе и т. д. [Noventa, 2018]. У велигеров позади рта имеется пучок ресничек, который выполняет сенсорные функции и, возможно, участвует в удалении избытков пищевых частиц и слизи. На брюшной стороне тела велигера имеется еще два участка, покрытые ресничным эпителием: один между ртом и анусом, другой позади ануса, расположенного на брюшной стороне личинки, который принимает участие в удалении экскрементов из мантийной полости.

Кишечник велигера подразделяется на переднюю кишку, желудок, печеночные выросты, тонкую среднюю кишку и заднюю кишку. Передняя кишка выстлана ресничками, загоняющими пищу в желудок. На границе между передней кишкой и желудком имеется ресничный клапан, образованный спаянными между собой ресничками. Реснички, направленные внутрь желудка, препятствуют обратному выходу пищевых частиц. Как правило, уже на ранних стадиях развития появляется пигмент, окрашивающий личиночную печень (пищеварительную железу) в бурый или зеленоватый цвет. Печёночная ткань врастает в стенку желудочного расширения, и затем соединяется с желудком, образуя его переднюю и большую часть боковых стенок. Среди вакуолизированных клеток, участвующих во внутриклеточном переваривании пищи, расположены мелкие клетки – зачатки тканей дефинитивной (окончательно сформированной) печени.

Стенки желудка состоят из уплощённого эпителия. По мере развития на задней стенке желудка появляется слепой вырост, который представляет собой железу кристаллического стебелька. Кристаллический стебелек вращается благодаря биению ресничек и перемешивает пищу в желудке. Задний конец желудка переходит в тонкую среднюю кишку, выстланную ресничками. Их биение обеспечивает продвижение пищи в узком просвете средней кишки.

Первые зачатки жабр появляются у личинок на стадии великонхи в виде пучков ресничек на внутренней поверхности мантии в задней части тела личинки. Перед этими пучками развиваются невысокие валики – зачатки будущих жаберных филламентов, покрытые короткими ресничками – крошечными вибрирующими волосками, согласованный и скоординированный ритм которых вызывает поток воды.

После метаморфоза личинок у ювенильных особей (спата) жабры уже полностью сформированы. Через входной сифон вода с микроводорослями попадает к жабрам. Там микроводоросли отфильтровываются, обволакиваются слизью и при помощи ресничек, расположенных вдоль специальных канавок на жабрах, передаются к лабиальным пальпам. Пальпы направляют их к ротовому отверстию, а вода с непригодными для питания частицами в виде псевдофекалий возвращается в окружающую среду через сифон.

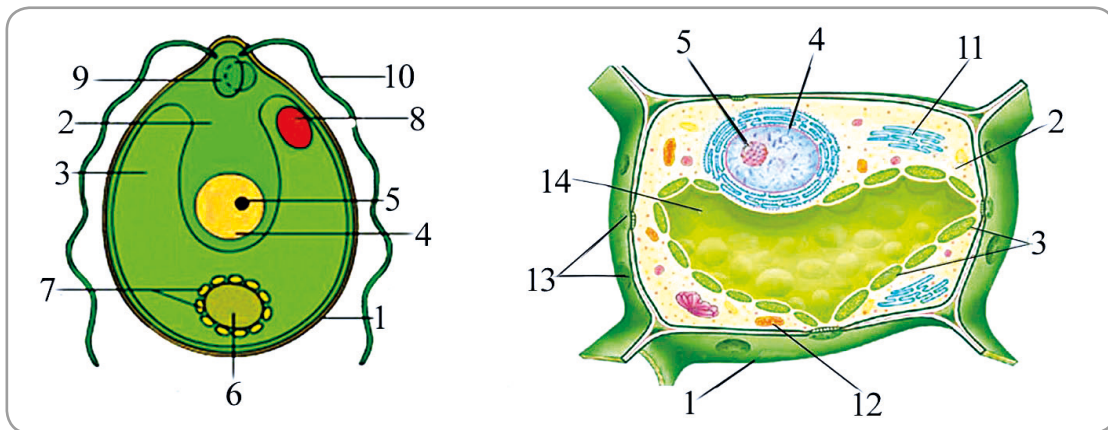
Основная пища личинок – растительный компонент нанопланктона. Другими источниками пищи могут быть мелкие частицы неживого органического вещества (детрит) вместе с бактериями, а также растворённое органическое вещество. Максимальный рост личинок наблюдается при оптимальной концентрации микроводорослей и зависит от их видового состава.

## **2.2. Биология микроводорослей**

### **2.2.1. Морфология и анатомия одноклеточных водорослей**

Клетка – основная структурная единица водорослей, представленных либо одноклеточными, либо многоклеточными формами. Особенность одноклеточных форм заключается в том, что они состоят всего из одной клетки, поэтому в их строении и физиологии сочетаются клеточные и организменные черты. Клетка водорослей представляет собой целостную живую систему. Она состоит из трёх неразрывно связанных между собой частей: оболочки, цитоплазмы и ядра (рис. 14).

*Оболочка клеток.* Снаружи клетки водорослей покрыты плотной оболочкой. Через оболочку осуществляется непосредственное взаимодействие клетки с внешней средой. Оболочка состоит из наружного слоя и расположенной под ним плазматической мембраны. Внутренние слои оболочки на 60–80 % состоят из чистой клетчатки (целлюлозы), а наружные (20–40 %) – из пектиновых веществ. Нитчатые молекулы целлюлозы собраны в оболочках в структурные единицы – микрофибриллы, составляющие каркас оболочки. В большинстве случаев оболочка состоит из 2–3, реже 4 слоёв. У водоросли толщина оболочки изменяется в зависимости от возраста, состояния клетки и условий культивирования.



**Рисунок 14.** Внешний вид клетки водорослей: 1 – клеточная оболочка; 2 – цитоплазма; 3 – хлоропласт; 4 – ядро; 5 – ядрышко; 6 – пиреноид; 7 – зёрна крахмала; 8 – глазок (стигма); 9 – сократительные вакуоли; 10 – жгутики; 11 – диктиосомы; 12 – митохондрии; 13 – поры; 14 – вакуоль [http://shkola.ostriv.in.ua]

Клеточные оболочки водорослей весьма разнообразны по своему строению и химическому составу. У многих водорослей клеточные оболочки пропитаны солями кальция (зелёные, бурые, красные водоросли) или кремния (диатомовые).

Оболочка клеток водорослей пронизана порами, размеры которых колеблются от 12 до 60 нанометров (нм), через которые осуществляется связь с внешней средой. Она играет очень важную роль: представляет собой внешний каркас или защитную оболочку; обеспечивает тургор клеток; через неё проходит вода, соли, молекулы многих органических веществ.

Под клеточной оболочкой расположена плазматическая мембрана, граничащая непосредственно с цитоплазмой. Толщина плазматической мембраны около 10 нм. В состав плазматической мембраны входят белки и липиды. Они расположены упорядоченно и соединены друг с другом химическими связями. Молекулы липидов в плазматической мембране образуют два слоя.

Молекулы белков располагаются в слое липидов, погружаясь в него на разную глубину. Молекулы белка и липидов подвижны, что обеспечивает динамичность плазматической мембраны.

Плазматическая мембрана выполняет много важных функций, от которых зависит жизнедеятельность клеток. Например, образование барьера, отделяющего внутреннее содержимое клетки от внешней среды. Но между клеткой и внешней средой постоянно происходит обмен веществ. Из внешней среды через очень тонкие каналы плазматической мембраны в клетку поступает вода, разнообразные соли в виде отдельных ионов, неорганические и органические молекулы. Из клетки, также через плазматическую мембрану, выводятся продукты обмена и некоторые вещества, синтезированные в клетке.

*Цитоплазма.* Цитоплазма представляет собой внутреннюю полужидкую среду клетки, отделённую от внешней среды плазматической мембраной. В цитоплазме протекают основные процессы обмена веществ. Она объединяет в одно целое ядро и все органеллы, обеспечивает их взаимодействие, в результате чего клетка функционирует как целостная единая живая система. В клетках водорослей содержатся следующие основные органеллы: вакуоли, эндоплазматическая сеть, аппарат Гольджи, митохондрии, хлоропласты.

*Ядро.* В большинстве случаев в клетке водоросли находится одно ядро, которое содержит ядерный сок, ядрышко и хроматин.

Размеры ядра клеток водорослей различны: от 2–3 до 50 мкм (у половых клеток). Форма ядра чаще всего шаровидная или эллипсоидная. Его размеры и форма определяются формой и размером клетки. В молодых клетках оно занимает центральное положение, но позднее ядро смещается к оболочке, оттесняемое растущей вакуолью. В ядре находится одно или несколько ядрышек. Снаружи ядро покрыто ядерной оболочкой, состоящей из двух мембран (наружной и внутренней), между которыми имеется щель (околоядерное пространство). Наружная мембрана оболочки образует выросты, переходящие в стенки эндоплазматической сети. Связь эндоплазматической сети с околоядерным пространством через поры обеспечивает тесный контакт между ядром и цитоплазмой.

Хроматин – это хромосомы в деспирализованном состоянии. Хромосомы состоят из двух хроматид, соединённых перемычкой – центромерой. Основой хромосом является молекула ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота), которая несёт информацию о строении белков клетки.

Ядрышко – обособленная, более уплотнённая часть ядра округлой или овальной формы. Предполагается, что ядрышко является центром синтеза РНК (рибонуклеиновой кислоты).

В цитоплазме сосредоточены вакуоли и разнообразные включения – углеводы, жиры и белки, которые синтезируются в клетке.

*Вакуоли.* Вакуольная система водорослей может быть представлена вакуолями разных размеров. У большинства одноклеточных водорослей вакуоль занимает определенное место в клетке. Содержимое вакуоли – клеточный сок, который представляет собой слабокислый водный раствор (рН 2–5), содержащий минеральные соли, углеводы, органические кислоты, кислород, углекислый газ. В молодых делящихся клетках вакуоли представляют систему канальцев и пузырьков (провакуоли). По мере роста клеток они увеличиваются, а затем сливаются в одну большую центральную вакуоль, которая занимает от 70 до 90 % объёма клетки, поэтому увеличение размеров клетки происходит в основном за счёт роста вакуоли.

Для подвижных одноклеточных водорослей (а иногда и неподвижных) характерно наличие сократительных вакуолей (пульсирующих вакуолей), расположенных обычно у жгутиковых форм в основании жгутиков и выполняющих роль осморегулятора. Эти вакуоли ритмически пульсируют, т. е. попеременно сокращаются и расширяются.

У многих золотистых и зелёных водорослей имеется одна или несколько таких вакуолей, которые при сокращении выбрасывают содержащуюся в них жидкость в цитоплазму, или через специальные выводные каналы выбрасывают из клетки продукты метаболизма.

*Эндоплазматическая сеть.* Вся внутренняя зона цитоплазмы заполнена многочисленными мелкими каналами и полостями, стенки которых представляют собой мембраны, сходные по своей структуре с плазматической мембраной. Эти каналы ветвятся, соединяются друг с другом и образуют сеть, получившую название эндоплазматической сети. Эндоплазматическая сеть неоднородна по своему строению, и потому различают два типа – гранулярная и гладкая. На мембранах каналов и полостей гранулярной сети располагается множество мелких округлых телец (диаметром 15–20 нм) – рибосом, которые придают мембранам шероховатый вид. В одной клетке содержится много тысяч рибосом, которые могут располагаться не только на мембранах гранулярной эндоплазматической сети, но и свободно лежать в цитоплазме. В состав рибосом входят белки и РНК. Функция рибосом – синтез белка. Синтезированные белки сначала накапливаются в каналах и полостях эндоплазматической сети, а затем транспортируются к органоидам и участкам клетки, где они потребляются. Эндоплазматическая сеть и рибосомы, расположенные на её мембранах, представляют собой единый аппарат биосинтеза и транспортировки белков.

На мембранах гладкой эндоплазматической сети происходит синтез липидов и углеводов, которые накапливаются, а затем транспортируются к различным органеллам клетки. Эндоплазматическая сеть связывает между собой основные органеллы клетки – аппарат Гольджи, хлоропласты, митохондрии, пиреноиды, стигма.

*Аппарат Гольджи.* В клетках водорослей аппарат Гольджи состоит из отдельных диктиосом – стопок из 2–7 и более плоских круглых мешочков или цистерн диаметром около 1 мкм и толщиной 20–40 нм. Одна из главных функций аппарата Гольджи – регуляция содержания воды в клетке. По каналам эндоплазматической сети к нему транспортируются продукты синтетической деятельности клетки – белки, углеводы и липиды. Все эти вещества сначала накапливаются, а затем, в виде крупных и мелких пузырьков, поступают в цитоплазму и используются самой клеткой в процессе её жизнедеятельности, либо выводятся из неё. Кроме того, на мембранах аппарата Гольджи происходит синтез липидов и углеводов (полисахаридов), которые используются в клетке, либо входят в состав мембран.

*Хлоропласты.* Клетки водорослей содержат хлоропласты (хроматофоры). Они могут быть чашевидными, лентовидными, спиралевидными, пластинчатыми, звёздчатыми. У большинства одноклеточных водорослей в клетках содержится по одному хроматофору. У некоторых видов водорослей хлоропласты имеют вид зёрен или дисков, сосредоточенных в пристеночной цитоплазме. Размеры хлоропластов – 4–6 мкм; от цитоплазмы они отделены двумя мембранами – наружной и внутренней.

Наружная мембрана гладкая, без складок и выростов, а внутренняя образует много складчатых выростов, направленных внутрь хлоропласта, поэтому внутри хлоропласта сосредоточено большое количество мембран, образующих особые структуры – граны. В них содержится пигмент хлорофилл *a*. Хлоропласт – основной органоид клеток водорослей, в котором происходит фотосинтез, т. е. образование органических веществ (углеводов) из неорганических веществ: углекислого газа ( $\text{CO}_2$ ) и воды ( $\text{H}_2\text{O}$ ) при использовании энергии солнечного света. Продукты фотосинтеза, образуемые в клетке, могут откладываться в хлоропласте, в цитоплазме или в клеточном соке. В хлоропласте обычно откладывается крахмал.

Между внутренними мембранами хлоропласта содержатся ДНК, РНК и рибосомы. Следовательно, в хлоропластах, так же как и в рибосомах, происходит синтез белка. Хлоропласты размножаются делением.

В матриксе хлоропласта находятся особые включения – *пиреноиды*. Они представляют собой образование белковой природы, размером 3–12 мкм и обычно окружены крахмальными зёрнами. Пиреноиды находятся внутри хлоропласта или на его поверхности; гораздо реже они расположены в цитоплазме (у криптофитовых водорослей).

Пиреноиды бывают двух видов: скорлупчатые и голые. Скорлупчатые пиреноиды в развитом состоянии окружены покровом из крахмала или близких к нему углеводов. Голые – лишены его, и их функция не вполне выяснена. Наличие пиреноидов того или другого рода имеет известное систематическое значение. Голые пиреноиды особенно характерны для золотистых, диатомовых, бурых и красных, скорлупчатые – для большинства зеленых и пиропитовых водорослей.

У подвижных форм водорослей в хлоропласте располагается специфическая фоторецепторная органелла – *стигма*, или глазок, имеющая сферическую, палочковидную, линзовидную или трапециевидную форму. Глазок обычно имеет кирпично-красный цвет, т. к. содержит пигмент астаксантин. Стигма состоит из двух частей: бесцветной и окрашенной. Бесцветная часть стигмы играет роль линзы, концентрирующей световые лучи, поэтому основная функция стигмы – регуляция направленного движения клеток путём улавливания световых импульсов и передачи их жгутиковому аппарату. В клетках водорослей, длительное время находящихся в темноте, глазок исчезает, но при перенесении их на свет появляется снова.

*Жгутики*. Одноклеточные водоросли бывают подвижные и неподвижные. Подвижные клетки снабжены одним или несколькими жгутиками, при помощи которых клетки передвигаются. По соотношению длины жгутиков в одной клетке, водоросли можно разделить на две группы: равножгутиковые и разножгутиковые. У разножгутиковых длинный жгутик направлен вперёд и работает энергичнее, чем короткий, который обращён в сторону или назад по ходу движения клетки. Жгутики бывают гладкими или опушёнными. У равножгутиковых водорослей оба жгутика опушены; у разножгутиковых опушён преимущественно двигательный, передний жгутик.

У некоторых золотистых водорослей между двумя подвижными жгутиками располагается третий – неподвижный жгутик. С его помощью клетка прикрепляется к субстрату (твёрдой поверхности).

*Митохондрии.* В цитоплазме всех живых эукариотических клеток содержатся мелкие тельца (0,2–7 мкм) – митохондрии. По форме они чаще всего бывают эллиптические или округлые, а число их варьирует от нескольких десятков до сотен. Внутреннее строение митохондрий изучено с помощью электронного микроскопа. Снаружи митохондрии окружены оболочкой, состоящей из двух мембран – наружной и внутренней. Наружная мембрана гладкая и не образует никаких складок и выростов. Внутренняя мембрана, напротив, образует многочисленные складки, которые направлены в полость митохондрии. Складки внутренней мембраны называют кристами (лат. «криста» – гребень, вырост). Число крист в митохондриях зависит от функциональной активности клеток. Кристы бывают разной формы: диско-видные (у эвгленовых водорослей), трубчатые (у динофитовых водорослей), пластинчатые (у зелёных, красных и криптофитовых водорослей).

Митохондрии называют «энергетическими станциями клеток», т. к. их основная функция – синтез аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ). Эта кислота синтезируется в митохондриях клеток всех организмов. Энергия, запасаемая АТФ, производится в результате окисления в митохондриях различных энергетически богатых веществ, главным образом сахаров.

Таким образом, мелкие, не видимые простым глазом одноклеточные водоросли, являются своеобразной фабрикой, которая добывает сырьё (поглощая из окружающей среды растворы минеральных солей и углекислоту), перерабатывает и производит белки, углеводы и липиды.

### **2.2.2. Размножение водорослей**

Для одноклеточных водорослей характерно три типа размножения: *вегетативное, бесполое и половое.*

*Вегетативное размножение.* Почти все одноклеточные водоросли способны размножаться простым делением надвое. Клетка водоросли вытягивается, и на экваторе намечается поперечная перегородка, постепенно углубляющаяся и делящая организм на две более или менее равные части. В результате возникают две новые дочерние клетки, совершенно аналогичные родительской клетке. Затем обе дочерние клетки, в свою очередь, тоже делятся, и этот процесс может продолжаться некоторое время. У жгутиковых форм встречаются наиболее сложные типы вегетативного размножения:

- Размножение в подвижном состоянии, сопровождаемое продольным делением тела надвое. Каждая из клеток получает половину жгутиков, имевшихся до начала размножения, а другую достраивает.
- Размножение в неподвижном состоянии, когда водоросли перед делением становятся неподвижными, сбрасывают внешнюю часть жгутика и окутываются слизистым чехлом. Сначала у них делится ядро, затем образуется новый жгутиковый аппарат, после чего клетка делится пополам.



*Бесполое размножение* водорослей осуществляется с помощью специализированных клеток – спор или зооспор (спор со жгутиками). Они отличаются от обычных вегетативных клеток формой и меньшими размерами. По форме они бывают шаровидными, эллипсоидными или яйцевидными, покрытыми оболочкой или без неё.

Споры и зооспоры образуются из особых клеток, называемых спорангиями. У большинства одноклеточных водорослей бесполое размножение осуществляется посредством зооспор. Зооспоры могут иметь различное строение, что в известной мере отражает различия в строении одноклеточных водорослей. Зооспоры бывают с одним, двумя или множеством жгутиков; в последнем случае они располагаются венчиком на конце.

Споры и зооспоры, окружённые слизистой оболочкой, выходят в воду через отверстие в стенке спорангия. На выходе зооспоры, находясь ещё в общей оболочке, начинают активно двигаться, а после разрыва оболочки моментально расплываются в разные стороны.

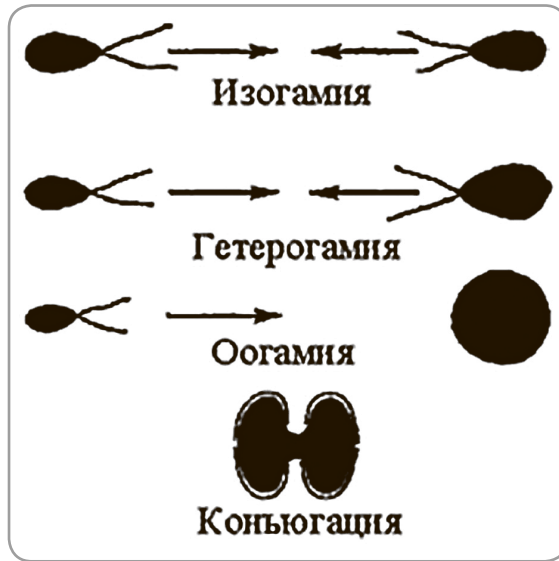
При бесполом размножении, так же как и при вегетативном, не происходит рекомбинации и слияния наследственного материала, поэтому дочерние особи несут тот же набор генов, что и родительские.

*Половое размножение водорослей* – это слияние двух клеток и обмен наследственной информацией. При половом размножении у водорослей формируются мужские и женские половые клетки (гаметы). Гаметы выходят в воду и соединяются попарно. Мужская половая клетка сливается с женской, т. е. происходит оплодотворение с образованием зиготы. У одноклеточных водорослей мужские гаметы, как правило, имеют жгутики, а у женских они не всегда бывают. Гаметы сильно варьируют по размерам, форме и подвижности. Поэтому, половое размножение водорослей имеет множество форм и уровней сложности и бывает нескольких типов:

- гологамия (конъюгация) – без образования специализированных клеток;
- гаметогамия – с помощью специализированных клеток – гамет.

Гологамия – процесс слияния двух неподвижных, лишённых клеточных оболочек вегетативных клеток, который называется конъюгацией. Оплодотворение происходит путём взаимного обмена мигрирующими ядрами, перемещающимися из одной клетки в другую через специально образующийся конъюгационный канал. Происходит слияние двух гамет в одну клетку – зиготу, которая впоследствии покрывается толстой оболочкой и содержит большое количество запасных питательных веществ, а после периода покоя прорастает, давая начало новым клеткам.

Гаметогамия. Половое размножение у водорослей происходит путём деления содержимого клеток и образования в них специализированных клеток – гамет. Гаметы образуются в вегетативных клетках либо в гаметангиях. В зависимости от размеров сливающихся гамет различают несколько типов гаметогамии – изогамия, гетерогамия и оогамия (рис. 15).



**Рисунок 15.** Формы полового размножения одноклеточных водорослей

Для большинства одноклеточных водорослей характерен процесс оогамии, который протекает следующим образом: крупная женская гамета, превращаясь в яйцеклетку, оплодотворяется маленькой подвижной мужской гаметой. Образовавшаяся в результате слияния гамет зигота превращается в зигоспору с запасами питательных веществ, покрывается многослойной целлюлозной оболочкой и зимует. После периода покоя, длящегося от нескольких недель до нескольких лет в зависимости от вида водорослей, зигоспора начинает расти. При прорастании, сопровождающимся делением, образуются 4 зооспоры, которые дают начало новым клеткам.

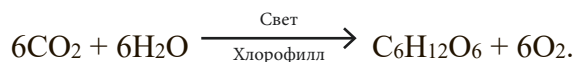
Автогамия – половой процесс, характерный для некоторых диатомовых водорослей. Ядро клетки предварительно делится в процессе мейоза (деления-созревания половых клеток) на 4 ядра, два из них разрушаются, и оставшиеся два ядра сливаются, образуя зиготу (диплоидное ядро), которая без периода покоя увеличивается в размерах и превращается в ауксоспору. При автогамии не происходит увеличение числа клеток, а лишь их омоложением.

### 2.2.3. Питание водорослей

Водоросли по способу питания являются автотрофами. В ходе эволюции у них выработалась способность использовать для питания такие полностью окисленные вещества, как углекислота и вода, и создавать на их основе органические соединения. Этот процесс осуществляется за счёт солнечного света и сопровождается выделением кислорода.

Использование световой энергии для биологического синтеза стало возможным благодаря появлению у водорослей комплекса пигментов, поглощающих свет, важнейшим из которых является хлорофилл. Процесс светового и углеродного питания растений получил название фотосинтеза.

В общем виде суммарное уравнение фотосинтеза может быть записано:



Таким образом, фотосинтез – биохимический процесс преобразования световой энергии в химическую.

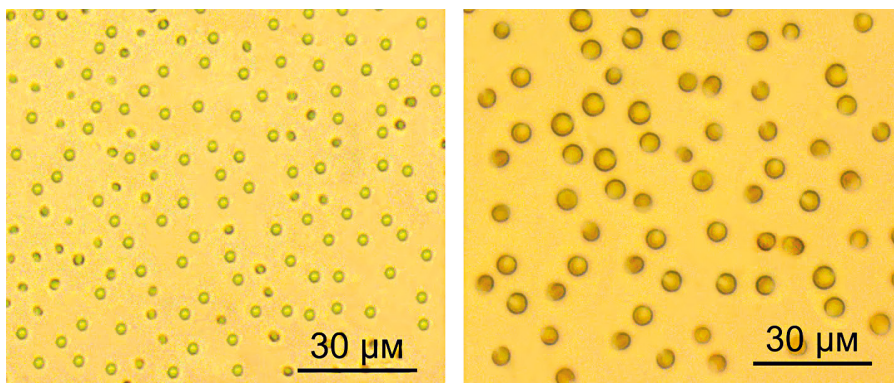
Второй, не менее важной особенностью питания водорослей является их способность усваивать азот, серу, фосфор, калий и другие минеральные элементы в виде ионов минеральных солей и использовать их для синтеза таких важнейших компонентов живой клетки, как аминокислоты, белки, нуклеиновые кислоты.

#### 2.2.4. Кормовые микроводоросли

В аквакультуре, в зависимости от выращиваемых объектов (моллюски, рыбы, креветки и т. д.) в качестве корма используется около 20 видов микроводорослей. В коллекции ФИЦ ИнБЮМ содержится 10 видов кормовых микроводорослей, используемых при выращивании гигантской устрицы в питомнике. Эти водоросли относятся к четырём классам: золотистые, зелёные, диатомовые и криптофитовые.

Специалисты по марикультуре обычно все одноклеточные водоросли разделяют на две группы – жгутиковые и безжгутиковые.

Золотистые водоросли – *Isochrysis galbana* и *Monochrysis lutheri* – одноклеточные водоросли, шаровидной или яйцевидной формы с двумя бичевидными жгутиками одинаковой длины. Размеры клеток водорослей варьируют от 2 до 6 мкм (рис. 16). Клетки лишены клеточной оболочки и покрыты только плазмалеммой. В клетке имеется одно небольшое ядро, один пристеночный корытоподобный хлоропласт, окрашенный в золотисто-жёлтый цвет. Пигменты представлены хлорофиллами,  $\alpha$  и  $\gamma$ ,  $\beta$ -каротином и ксантофиллами (особенно много фукоксантина и лютеина), от которых зависит окраска водорослей.



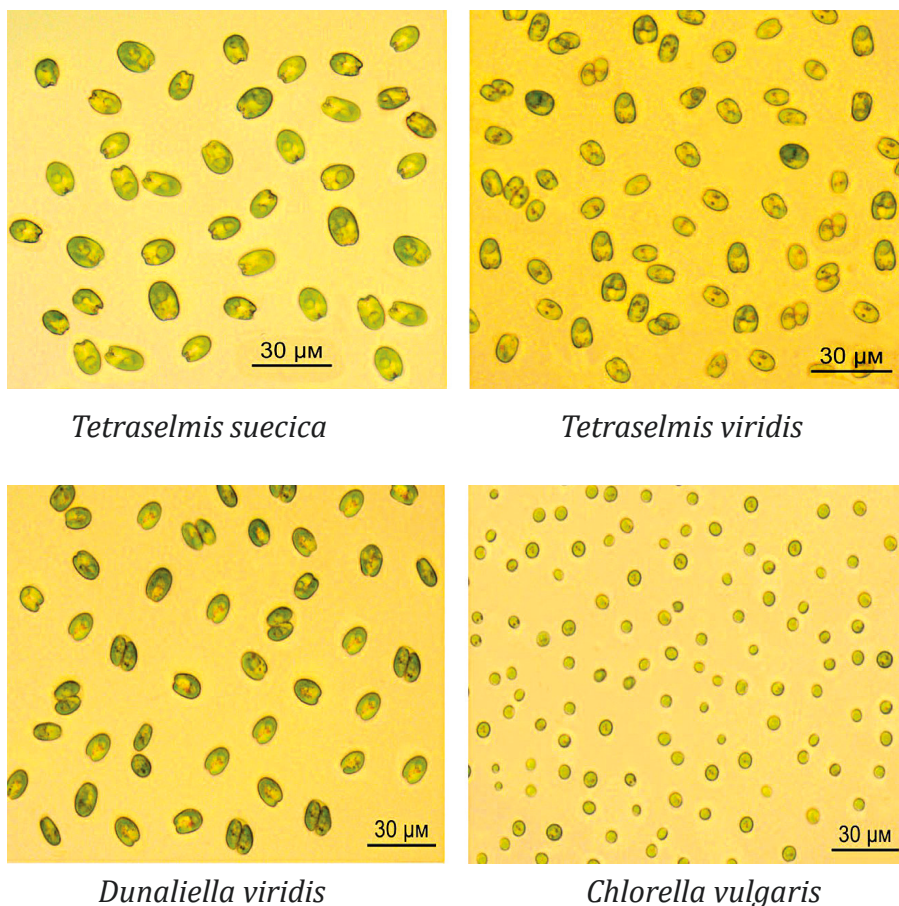
*Monochrysis lutheri*

*Isochrysis galbana*

**Рисунок 16.** Золотистые микроводоросли *Isochrysis galbana* и *Monochrysis lutheri* (жгутиковые водоросли)

Размножаются водоросли простым делением клетки, а иногда наблюдается бесполое размножение с помощью зооспор. Половой процесс (клетки диплоидны) – изогамия, конъюгация. В результате полового процесса, а также в неблагоприятных условиях образуются цисты с толстой оболочкой, содержащей кремний.

Зелёные одноклеточные водоросли. Жгутиковые – *Tetraselmis suecica*, *Tetraselmis viridis*, *Dunaliella viridis*; безжгутиковая – *Chlorella vulgaris*. Форма клеток: эллипсоидная, яйцевидная или грушевидная. Клеточная оболочка состоит из двух слоёв: внутренний – целлюлозный, наружный – пектиновый, а у *D. viridis* клетка покрыта только тонкой бесцветной протоплазматической мембраной (рис. 17).



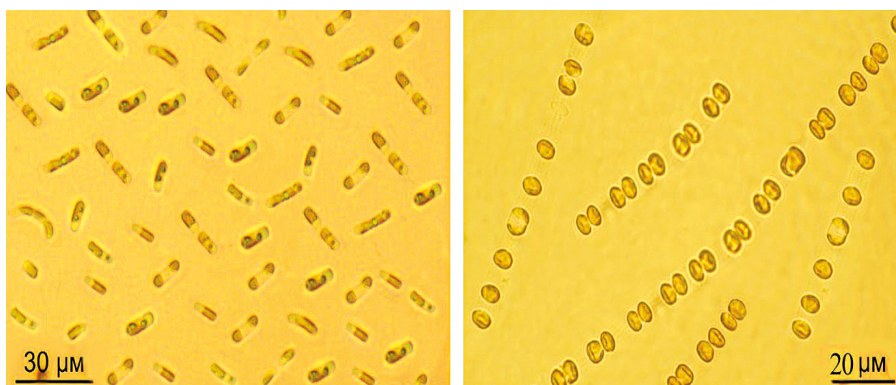
**Рисунок 17.** Зелёные одноклеточные водоросли

Клетки зелёных водорослей бывают подвижные со жгутиками на переднем конце и неподвижные пассивно плавающие (*C. vulgaris*). Зелёная окраска обусловлена содержанием в них хлорофилла. Хлоропласты обычно окрашены в различные оттенки зелёного цвета. Окраска обусловлена наличием

хлорофиллов, *a* и *b*, а также  $\beta$ - и  $\gamma$ -каротинов. Хлоропласты содержат от одного до нескольких десятков пиреноидов. Предполагают, что пиреноиды зелёных водорослей продуцируют энзимы, которые полимеризируют молекулы глюкозы в крахмал. Крахмал образует вокруг пиреноида сплошную или состоящую из отдельных зёрен обкладку.

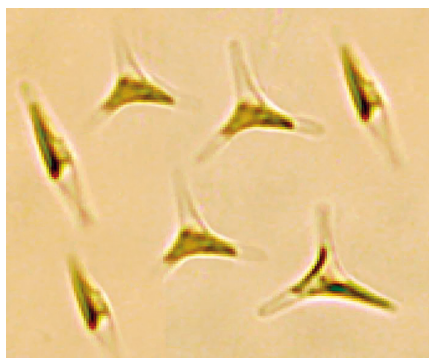
Размножаются микроводоросли вегетативным, бесполом и половым путём. Бесполое размножение осуществляется с помощью зооспор со жгутиками одинаковой длины и строения. Половой процесс у них представлен изогамией, гетерогамией и оогамией. Зооспоры и гаметы имеют 2 или 4 жгутика, которые расположены на переднем конце клетки. Продукт ассимиляции зелёных водорослей – крахмал и жирные кислоты.

Диатомовые водоросли – *Chaetoceros calcitrans*, *Phaeodactylum tricorneratum*, *Skeletonema costatum* – совершенно особая группа одноклеточных водорослей, клетки которых приспособлены к парению в водной среде за счёт облегчённого веса в результате накопления в протопласте жирных кислот (рис. 18). Самое большое количество жирных кислот накапливается в клетках водорослей в условиях длительной вегетации и значительно снижается во время активного деления клеток.



*Chaetoceros calcitrans*

*Skeletonema costatum*



*Phaeodactylum tricorneratum* (увеличение  $\times 630$ )

**Рисунок 18.** Диатомовые водоросли (безжгутиковые)

Клетка диатомовых водорослей состоит из протопласта, заключённого в пектиновую оболочку, снаружи которой имеется плотная кремневая оболочка – панцирь. Кремневый панцирь состоит из двух половинок (створок) – нижней (гипотеки) и верхней (эпитеки). Толщина стенок панциря зависит от концентрации кремния в среде и изменяется в значительных пределах: у тонкостенных форм – от сотых до десятых долей микрометра, у толсто-стенных – до 1–3 мкм. Ядро у диатомовых водорослей всегда одно и лежит в центральной части цитоплазмы.

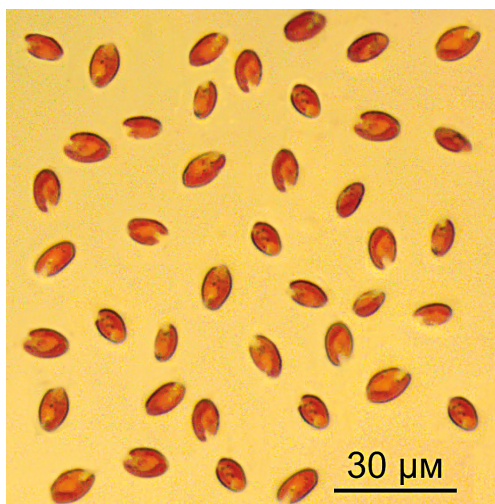
В клетке имеется одна вакуоль с клеточным соком. В цитоплазме располагаются пластинчатые хлоропласты в виде дисков или зернистые в виде мелких зёрнышек. В зависимости от набора пигментов, среди которых преобладают  $\beta$ -каротин и ксантофиллы, имеющие жёлтые и бурые оттенки, маскирующие хлорофиллы, а и с, окраска хлоропластов имеет различные оттенки жёлто-бурого цвета.

Размножаются диатомовые водоросли вегетативным и половым способом. У диатомовых водорослей особый случай вегетативного размножения. В клетке происходит деление ядра и хроматофоров, затем протопласт материнской клетки делится надвое, при этом одна дочерняя клетка имеет эпитеку, а вторая гипотеку. После деления дочерние протопласты достраивают недостающую им створку.

В результате деления одна из дочерних клеток, получившая от материнской эпитеку, точно повторяет размеры материнской клетки. Вторая дочерняя клетка, получившая гипотеку, будет несколько меньших размеров. В результате многочисленных делений происходит постепенное уменьшение размеров клеток микроводорослей. Клетки диатомовых водорослей в вегетативном состоянии диплоидны. Гаплоидны у них только гаметы, образующиеся непосредственно перед половым процессом, который может происходить в форме изогамии, гетеро- или оогамии. Перед половым размножением происходит редукционное деление ядра (мейоз). Две клетки диатомей сближаются, створки раздвигаются, гаплоидные (после мейоза) ядра попарно сливаются, и образуются одна или две ауксоспоры – «растущие споры». Ауккоспора некоторое время растёт, а затем образует панцирь и превращается в вегетативную клетку.

После завершения роста и созревания ауксоспоры в ней развивается новая клетка, у которой сначала образуется большая (внешняя), а затем меньшая (внутренняя) половина панциря. По размерам эти клетки значительно превышают родительские. Таким образом, половой процесс приводит к восстановлению размеров клеток, измельчавших в результате вегетативного размножения. Продукт ассимиляции диатомовых водорослей – жирные кислоты, которые накапливаются в вакуолях.

Криптофитовые водоросли – *Rhodomonas salina* (рис. 19).



**Рисунок 19.** Криптофитовая водоросль *Rhodomonas salina* (жгутиковая форма)

Клетки овальной формы, снаружи покрыты перипластом. Передний конец клетки скошен, от него отходит продольная борозда. Клетки подвижные, имеют два жгутика, длина которых сопоставима с длиной клетки. На переднем конце клетки имеется одна сократительная вакуоль. Хлоропласт один, пластинчатый, пристеночный красно-коричневого цвета. Пигментный состав включает хлорофиллы, а и с, каротины, ксантофиллы и фикобилины (фикоэритрин). Продукт ассимиляции – крахмал.

## Глава 3. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ УСТРИЦЕВОДСТВА

### 3.1. Получение и выращивание личинок и спата гигантской устрицы

#### 3.1.1. Отбор и кондиционирование производителей

Производителей отбирают в зависимости от размера, формы, внешних показателей состояния их раковины и скорости роста. Маточное стадо следует формировать не менее чем из двух популяций устриц в количестве около 100 экз. Производители должны быть с видимым ростовым краем и здоровой раковиной и выращены в экологически чистой акватории. При этом устриц нужно отбирать разного возраста от 1 до 4 лет для обеспечения оптимального соотношения полов (среди устриц старших возрастов чаще встречаются самки).

Например, во французских питомниках устриц для маточного стада отбирают из различных мест побережья Франции [Robert, Gerard, 1999]. Для повышения генетического разнообразия будущего поколения часть производителей берут из собственного маточного стада питомника, а часть – из природных банок. Проводятся групповые скрещивания производителей (15–20 экз.) возраста 2–4 года.

Производители, участвующие в нересте, не должны использоваться в последующие годы. Содержащееся на ферме маточное стадо должно регулярно обновляться за счёт доставки устриц из других регионов (России, стран черноморского бассейна, Франции и т. д.), что необходимо для предотвращения близкородственного скрещивания (инбридинга).

При сезонном выращивании личинок обходятся без этапа кондиционирования и начинают работу сразу с проведения искусственного нереста. Для этой цели берут моллюсков из моря с уже зрелыми гонадами.

В промышленном питомнике, с круглогодичным получением спата, обязательно должен реализовываться этап кондиционирования производителей, что при соблюдении оптимальных условий их содержания обеспечивает получение качественных гамет и, следовательно, жизнестойкой молоди.

Кондиционирование производителей проводится для увеличения продолжительности функционирования питомника с целью получения личинок в необычные для природных условий сроки. Основные методы кондиционирования производителей устриц в различных питомниках аналогичны и описаны в литературе [Utting, Millican, 1997; Helm et al., 2004]. Как правило, в питомниках отводится отдельное помещение для кондиционирования производителей. Освещение в них должно быть боковое, неяркое. Производителей нельзя тревожить, так как они реагируют на любые вибрации или смену освещения закрыванием створок и, следовательно, перестают питаться. Производители содержатся при низкой плотности посадки в проточной морской воде или в хорошо аэрированной воде с периодической её заменой.



Температура воды, в которой содержатся устрицы-производители, должна находиться в пределах +16...+17 °С, которая является достаточной для созревания гонад, но низкой для начала нереста.

Сезон размножения гигантской устрицы, как в естественных местах обитания (моря Дальнего Востока), так и при выращивании в Чёрном море, начинается с третьей декады июня и продолжается до середины августа [Раков, 1984]. Более раннее получение личинок, например, в апреле-мае, обеспечивает максимальный прирост спата до первой остановки роста в зимний период. Таким образом, появляется возможность сокращения продолжительности выращивания устриц до товарного размера.

Устричные питомники содержат своё маточное стадо, часть которого должна размещаться в садках в море, а часть готовится для стимуляции нереста в питомнике. Отобранных для нереста производителей тщательно очищают от организмов-обрастателей, которые в дальнейшем могут погубить всю работу. Затем выдерживают их в пресной воде в течение 15 мин. В это время из складок раковин устриц выходят полихеты и другие сопутствующие гидробионты. Устриц прополаскивают в фильтрованной морской воде и переносят в лотки для кондиционирования или нереста. Производителей распределяют на сетке, которую устанавливают в ёмкости на высоте 10 см от дна. Так удобнее проводить смену воды. Если применяется проточная система, то со дна постоянно вымываются продукты жизнедеятельности устриц. На дне аквариума монтируется система аэрации.

Кондиционирование производителей проводят в фильтрованной воде при обильном поступлении корма – микроводорослей *S. costatum*, *C. calcitrans*, *P. tricornutum*.

Аквариум для кондиционирования должен быть неглубоким, удлинённой (лоток) или квадратной формы. Объём воды в аквариуме с 50 производителями должен быть в пределах 30–40 л.

### **Условия проведения кондиционирования:**

1. Кондиционирование лучше проводить в проточном аквариуме с подачей корма перистальтическим насосом. Корм также может поступать регулируемым самотёком из баков.

2. Если для кондиционирования используется замкнутая система, то сырой вес производителей не должен превышать 2–3 г·л<sup>-1</sup> аквариума. При этом необходимо 2–3 раза в неделю полностью менять воду, чтобы предотвратить накопление бактерий и метаболитов.

3. Расход воды при кондиционировании должен быть не ниже 25 мл·экз.<sup>-1</sup>·мин.<sup>-1</sup>. В проточный аквариум объёмом 40–50 л помещают не более 1,7 кг моллюсков. Пример: в аквариуме объёмом 40 л с 18 устрицами средним весом 80 г расход воды равен 458 л·мин.<sup>-1</sup>.

4. В питомнике ФИЦ ИнБЮМ для кондиционирования производителей в больших объёмах культивируют 10 видов кормовых водорослей. Кондиционирование проходит эффективнее при кормлении смесью водорослей.

5. Размер суточного рациона (в сухом весе) составляет 2–4 % от сухого веса мягких тканей устрицы, определённого в начале кондиционирования. Среднее значение сухого веса одной устрицы определяют следующим образом: отбирают случайную выборку из 10 экз.; устриц вскрывают и удаляют мягкие ткани; влагу убирают при помощи фильтровальной бумаги и затем высушивают до постоянного веса в течение 48 ч при температуре +65 °С (сухой вес мягких тканей составляет примерно 15–17 % сырого веса). Эти данные используются для расчёта рациона. Ниже приведена формула для определения суточного рациона водорослей (в сухом весе) для 1 экз. устрицы [Helm et al., 2004]:

$$R = \frac{3 \times W_{\text{м.тк.}}}{100\%},$$

где: R – рацион, г·экз.<sup>-1</sup>;

W<sub>м.тк.</sub> – среднее значение сухой массы мягких тканей, г.

Таким образом, 3 %-ный рацион устрицы с 0,75 г сухой массы мягких тканей составляет 0,0225 г сухого веса водорослей в сутки. Если рацион превышает 6 %, то в этом случае начинается быстрый соматический рост (вместо репродуктивного роста).

Очень важно суточный рацион дозировать с помощью перистальтического насоса для лучшего перемешивания с водой, где содержатся производители. Подача морской воды отключается на час после каждого добавления водорослей. В случае отсутствия в питомнике проточной системы пищевой рацион делится на несколько порций.

Весь период кондиционирования следует разбить на два этапа:

- **Начальный этап**, когда температура воды в море ещё низкая, очень эффективно кондиционировать производителей при промежуточной температуре, которая может быть средней между температурой воды в море и температурой воды, необходимой для кондиционирования. Кормление на начальном этапе должно быть обильным, особенно это важно для самок, поскольку процесс развития и созревания яйцеклеток более энергозатратный. По этой причине рацион должен содержать диатомовые (например, *C. calcitrans* или *S. costatum*) и жгутиковые микроводоросли, такие как *M. lutheri* и *I. galbana*, которые содержат высоконенасыщенные жирные кислоты.

- **Завершающий этап** наступает, когда температуру повышают на 1–2 °С в день, а рацион снижают с 4–6 % до 2–3 % от сухого веса мягких тканей.

Продолжительность кондиционирования гигантской устрицы в промышленных питомниках – 28–42 сут. при температуре 20–24 °С. Продолжительность кондиционирования производителей можно рассчитать заранее, если известна температура воды, при которой начинается процесс гаметогенеза у устриц в природных условиях (+10 °С) и оптимальная температура воды для кондиционирования в питомнике (например, + 20 °С). При указанных выше значениях температуры воды каждый день число градусо-дней будет

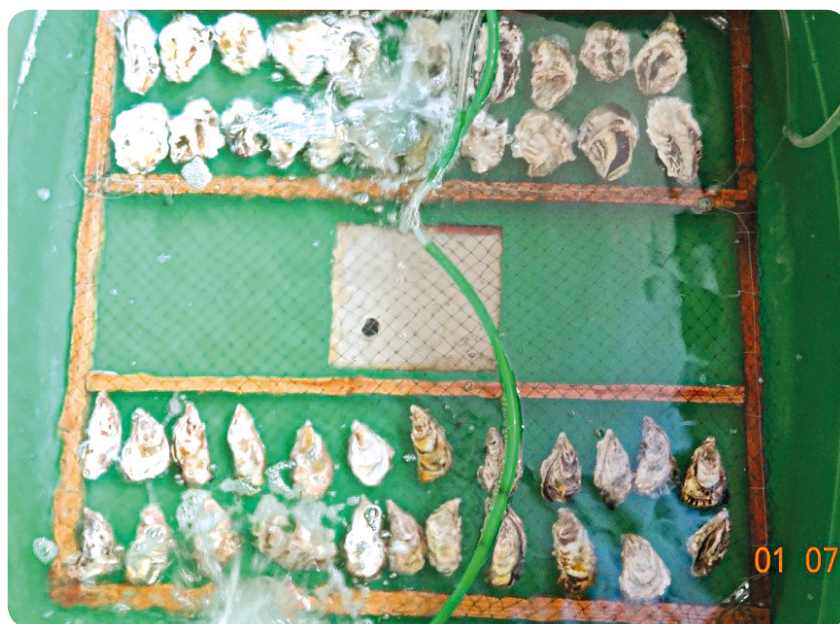
увеличиваться на 10 ( $20 - 10 = 10$ ). Таким образом, 30-дневный период кондиционирования при  $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$  будет составлять 300 градусо-дней. Это предполагаемая продолжительность созревания гамет. Примерно столько же градусо-дней требуется для созревания гонад устриц в море. По мере приближения сезона естественного размножения устриц продолжительность кондиционирования снижается и зависит от стадии гаметогенеза.

В круглогодично функционирующих питомниках обычно имеется от 5 до 20 лотков для кондиционирования производителей, в которые с интервалом в одну неделю помещаются новые партии устриц для обеспечения непрерывного получения личинок.

Однако отбор производителей прямо из моря в начале периода их естественного нереста в природных условиях обеспечивает лучшее качество яйцеклеток с точки зрения накопления в них питательных веществ (липидов). При этом для окончательного созревания гамет при оптимальном питании может потребоваться от 2 до 7 сут. кондиционирования.

### 3.1.2. Нерест и оплодотворение яйцеклеток

В питомнике ФИЦ ИнБЮМ во второй декаде июня, когда температура воды в море на глубине размещения садков с устрицами составляет  $+18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , производителей переносят на участок для кондиционирования. Их очищают от обрастания под проточной водой при помощи пластмассовых щёток и выдерживают в пресной воде в течение 15 мин., затем ополаскивают фильтрованной морской водой и распределяют на сетке, которую устанавливают в прямоугольном аквариуме на высоте 10 см от дна (рис. 20).



**Рисунок 20.** Кондиционирование производителей *Crassostrea gigas* в экспериментальном питомнике ФИЦ ИнБЮМ

На дне аквариума монтируется система аэрации. Ёмкость предварительно заполняется фильтрованной морской водой температуры +20 °С. Температуру воды удобно регулировать при помощи кондиционирования температуры воздуха в помещении.

Производителей содержат в течение суток в непроточной фильтрованной морской воде при постоянной аэрации, но без корма, при этом замену воды проводят дважды. В течение этого периода у производителей очищаются кишечник и жабры, что обеспечивает получение чистых половых продуктов. Нерест устриц обычно начинается на второй день после кондиционирования, первыми начинают нереститься самцы; их переносят в отдельные ёмкости.

При необходимости срочного получения половых продуктов, или при невозможности получения первым способом (когда, например, луна не находится в фазе полнолуния, поскольку массовый нерест гигантских устриц в местах естественного обитания приурочен к приливу), применяют стимуляцию нереста производителей. Растворённый в стерильной морской воде серотонин ( $C_{14}H_{19}N_5O_2 \cdot H_2SO_4$ ) при концентрации 0,003 %, в количестве 1 мл·экз.<sup>-1</sup> вводят при помощи шприца в межстворчатую полость устрицы, когда она приоткрывает створки в воде. Ткани устриц-производителей при этом не травмируются [Холодов и др., 2017].

Суспензию яйцеклеток пропускают через сито диаметром ячеи 65 мкм для очищения от фекалий и псевдофекалий. Затем собирают на сите с размером ячеи 40 мкм, при этом сито должно находиться под водой, промывают фильтрованной морской водой и переносят в отдельную ёмкость объёмом 10 л. Состояние (степень зрелости) яйцеклеток оценивают при помощи микроскопа (увеличение ×100). Зрелые яйцеклетки без ядер имеют округлую форму (диаметр около 55 мкм). Зрелость сперматозоидов оценивается по характерному движению и равномерному распределению их по всему объёму. Для определения концентрации яйцеклеток трижды отбирают пробу суспензии объёмом по 1 мл, помещают в камеру Богорова и подсчитывают их под микроскопом МБС-9. Концентрацию сперматозоидов подсчитывают в камере Горяева, предварительно обездвигив их парами формалина. При соотношении половых клеток 1 яйцеклетка и 8–10 сперматозоидов оплодотворение проходит без полиспермии. Через 15 мин. после оплодотворения яйца собирают на сите диаметром ячеи 40 мкм и промывают от оставшихся сперматозоидов. Выделение направительных телец указывает на успешное оплодотворение. Процесс оплодотворения и эмбрионального развития контролируется под микроскопом. Дальнейшее эмбриональное развитие проходит в фильтрованной морской воде с аэрацией при плотности посадки 50 тыс. яиц·л<sup>-1</sup>.

В питомниках Франции для ускорения процесса получения гамет применяют метод температурной стимуляции нереста [Robert, Gerard, 1999]. Для этого подготавливают морскую воду: профильтровывают её через серию фильтров с конечным размером пор в 1 мкм. Одну половину объёма воды до-

водят до температуры +12...+14 °С, а другую – до +25...+27 °С. Затем аквариум заполняют холодной водой и добавляют немного микроводорослей, чтобы моллюски открылись и начали фильтровать воду. Через 30–40 мин. воду сливают; аквариум заполняют тёплой водой и добавляют немного микроводорослей. Через 30–40 мин. воду меняют на холодную и т. д. Обычно нерест начинается через 1–4 ч после начала процедуры. Если в течение 2–3 ч нерест не начался, то устриц возвращают на дальнейшее кондиционирование.

Обычно первыми начинают нерест самцы; их извлекают из воды и держат на воздухе до тех пор, пока не наберётся достаточное количество яйцеклеток (в воде сперматозоиды быстро стареют). Через 30–60 мин. начинают нереститься самки, каждую из которых переносят в отдельный сосуд с фильтрованной водой (температура +24...+26 °С). Нерест самки длится не более 40–60 мин. Если же самка выметала много яйцеклеток, её пересаживают в другой сосуд. Для обеспечения генетического разнообразия отбирают гаметы минимум от 6 самцов и 6 самок.

В западноевропейских устричных питомниках практикуется способ получения половых продуктов методом резекции гонад после кондиционирования [Robert, Gerard, 1999; Helm et al., 2004]. При таком способе получения половых продуктов приходится жертвовать частью маточного стада, что не всегда приемлемо при проведении селекционной работы. Моллюсков вскрывают, скальпелем надрезают гонаду в нескольких местах и пипеткой с фильтрованной морской водой вымывают зрелые гаметы. Необходимо соблюдать осторожность, чтобы не произошло прокола пищеварительной железы и загрязнения гамет тканями, бактериями и другими микроорганизмами желудочно-кишечного тракта.

Полученную суспензию половых продуктов исследуют под микроскопом и определяют половую принадлежность и зрелость гамет. Зрелые сперматозоиды должны быть подвижными, а яйцеклетки, которые при вымывании имели грушевидную форму, в морской воде округляются в течение 20 мин.

Яйцеклетки от каждой самки собирают отдельно в чистые стеклянные стаканы объёмом от 2 до 5 л, затем их сливают в 10 л пластиковое ведро, которое на 75 % заполнено фильтрованной морской водой температуры +24 °С. Аналогичную процедуру проводят с самцами: в стеклянные стаканы сливают небольшие объёмы спермы от каждого самца.

Для проведения оплодотворения смешивают 2 мл сперматозоидов с 1 л яйцеклеток и оставляют их на 60–90 мин. (примерное соотношение – 8–10 сперматозоидов на яйцеклетку). Через 2 ч после оплодотворения яйцеклетки переносят в баки.

По появлению направительных телец под микроскопом (увеличение ×40) оценивают процент нормально развивающихся яиц. Для зрелых яйцеклеток показатели оплодотворения почти всегда превышают 90 %. До оплодотворения или в течение 20–30 мин. после него определяют количество яиц, так как плотность посадки эмбрионов не должна превышать 50 тыс. экз. · л<sup>-1</sup>. В течение последующего времени при соответствующей температуре воды

происходит первое деление оплодотворённых яйцеклеток на две одинаковые клетки; затем – второе с образованием 4 клеток: одной крупной и трёх меньшего размера.

### 3.1.3. Выращивание личинок

В экспериментальном питомнике ФИЦ ИнБЮМ оплодотворённые яйцеклетки для дальнейшего развития помещают в цилиндрические баки собственной конструкции объёмом 125 л (рабочий объём – 100 л), изготовленные из стеклопластика. В промышленных питомниках личинок выращивают в баках гораздо большего объёма – от 1 до 10 м<sup>3</sup>.

В течение первых суток при температуре воды +23 °С эмбрионы развиваются до стадии D-велигера, используя запасы питательных веществ яйца. При крупномасштабном выращивании 85 % нормально сформированных D-велигеров (от исходного числа эмбрионов) считается хорошим результатом развития. Личинки с аномально сформированной раковиной, как правило, дальше не развиваются.

Средняя длина раковины нормально развитых D-велигеров гигантской устрицы составляет около 75 мкм. При обмене воды они удерживаются на газ-сите с размером ячеей 45 мкм.

Замену воды в сосудах с D-велигерами проводят через 2 сут. после оплодотворения. Однако за день до обмена воды, т. е. через 24 ч после оплодотворения, в бак с личинками, необходимо добавить небольшое количество микроводорослей (*M. lutheri* или *I. galbana*). D-велигеры уже способны потреблять мелкие клетки водорослей, а также поглощать растворённые в воде питательные вещества.

Процесс замены воды в баке с личинками представлен на рис. 21. Сито с размером ячеей 60 мкм подвешено над ситом с размером ячеей 40 мкм, которое частично погружено в ведро с морской водой. В дальнейшем во время смены воды можно проводить селекцию личинок по размерам при помощи двух сит разных размеров, расположенных друг над другом (первое – с более крупной ячеей), как показано на рис. 21А.

При полном баке с личинками, сливной кран немного открывают, чтобы создать медленный ток воды в сито или серию сит, содержащихся в поддоне или в другой ёмкости. Такое расположение гарантирует, что дно нижнего сита всегда будет погружено в морскую воду, что сводит к минимуму повреждение раковин хрупких D-велигеров во время слива. По мере опорожнения бака, кран можно открыть сильнее. Личинок, оставшихся на дне и на стенках, смывают несколько раз фильтрованной морской водой.

Если при выращивании личинок применяются баки без кранов, то слив воды можно проводить через аналогичное расположение сит с использованием сифона из длинного гибкого шланга.



**Рисунок 21.** Оборудование, необходимое для обмена воды личинкам гигантской устрицы. А – расположение двух сит (сверху – с более крупной ячейкой); В1 – штемпель-пипетка для отбора проб личинок (стрелкой обозначен объём пробы в 1 мл); В2 – камера Богорова для подсчёта количества личинок; С – мерный стакан; D – градуированное ведро

Как только личинки полностью перенесены на сита, их аккуратно промывают фильтрованной морской водой, чтобы вымыть мелких личинок в нижнее сито. Личинок из обоих сит смывают в отдельные градуированные ёмкости (рис. 21С и 21D); затем определяют их количество.

Для подсчёта личинок их переносят в определённый объём воды (например, 1 л или 10 л), который перемешивают с помощью мешалки. Мешалка представляет собой диск с множеством отверстий, в центре которого закреплена перпендикулярно к диску длинная ручка. Диаметр диска несколько меньше диаметра сосуда. Перемещая мешалку вверх-вниз, перемешивают личинок в сосуде и отбирают пробы воды с личинками. Иногда личинок перемешивают ладонью, перемещая её вверх и вниз внутри сосуда. Для равномерного распределения личинок в объёме применяют способ переливания воды с личинками из одного градуированного сосуда в другой. Затем штемпель-пипеткой отбирают три пробы по 1 мл. Количество личинок подсчитывают под биноклем в камере Богорова, полученное среднее значение умножают на объём воды в сосуде. Аналогично проводится оценка выживаемости личинок на более поздних стадиях развития.

Одновременно отбирают пробу для последующего измерения длины раковины. Длину раковины личинок лучше всего измерять с помощью бинокля (например, МБС) с окуляр-микрометром.

Необходимо соблюдать осторожность при обращении с яйцами и личинками. При переносе яиц, эмбрионов или личинок из одной ёмкости в другую, сетка сита должна быть погружена в воду. Всё оборудование (ёмкости, сита, шланги, градуированные ёмкости, штемпель-пипетка и т. д.), используемое при обмене воды личинкам и при оценке их численности, должно быть предварительно тщательно промыто фильтрованной морской водой.

Особое внимание должно быть уделено качеству воды и её температуре. В течение всего периода выращивания необходимо поддерживать одинаковую температуру воды с личинками и использовать только фильтрованную морскую воду. Вопрос о необходимости стерилизации фильтрованной воды оспаривается специалистами, т. к. проточные ультрафиолетовые стерилизаторы не всегда оказываются эффективными. Особенно это касается случаев нарушения инструкций эксплуатации стерилизаторов: во-первых, применять нужно стерилизаторы только для морской воды; во-вторых, их нужно регулярно чистить и протирать спиртом; в-третьих, нельзя превышать допустимую скорость протока воды. И, наконец, для получения надёжных результатов рекомендуется соединять последовательно 2–3 стерилизатора.

Большое значение придаётся аэрации воды. Необходимо стремиться к тому, чтобы размеры пузырьков воздуха были минимальны, а их количество – максимальным и пузырьки должны быть равномерно распределены по объёму бака. Наиболее часто используются воздуходувки низкого давления с регулируемой скоростью подачи воздуха. Перед распределением по бакам с личинками, воздух фильтруется через серию фильтров-картриджей размерами пор от 0,22 до 0,45 мкм, что позволяет уменьшить количество загрязняющих веществ и микроорганизмов. Для очистки воздуха могут быть использованы также микробиальные фильтры. Кроме того, используют колонки для дегазации воды, которые извлекают из воды очень мелкие пузырьки воздуха, мешающие работе велума.

За культурой личинок требуется ежедневный уход. Для того чтобы предотвратить накопление потенциально вредных метаболитов, в течение всего периода выращивания личинок от D-велигера до начала метаморфоза, воду в баках необходимо полностью менять. Частота, с которой следует проводить замену воды, зависит от плотности посадки и среднего размера выращиваемых личинок. Как правило, воду обычно меняют ежедневно или через двое суток. На стадии велигера при плотности посадки личинок 20 тыс. экз.·л<sup>-1</sup> воду меняют каждый день с ежедневной подачей корма.

Если обмен воды личинкам проводится через 48 ч, то в периоды между сменами воды необходимо восстановить концентрацию корма в баке с личинками. Для этого отбирают пробы воды из каждого бака и подсчитывают концентрацию клеток водорослей с помощью микроскопа и камеры Горяева, затем добавляют смесь водорослей до восстановления суточной потребности в корме.



Целесообразно велигеров рассортировать по размерам и избавиться от слишком крупных личинок, которые могут иметь морфологические отклонения, а также от мелких личинок, которые в дальнейшем будут отставать в росте. Для сортировки личинок необходимо иметь набор сит с разными размерами ячеей (табл. 1).

**Таблица 1.** Подбор сит для сортировки личинок по размерам

Размеры ячеей (по диагонали) газ-сита, мкм	Размеры личинок, оставшихся на сите, мкм
45	75
80	120
120	145
150	170
160	210
180	255
200	280
220	300

Необходимое оборудование при выращивании личинок устриц: наборы сит, перфорированные поршневые мешалки, штемпель-пипетки и камеру Богорова можно заказать в специализированном магазине.

Если нет такой возможности, то набор сит можно изготовить, используя пластмассовые тазики с вырезанным дном, к которому с помощью эпоксидного клея приклеивается планктонный газ (рис. 22).



**Рисунок 22.** Личинки гигантской устрицы, собранные на сите в питомнике ФИЦ ИнБЮМ для переноса в чистую воду

Желательно иметь по несколько сит каждого размера, необходимых для работы с эмбрионами, личинками и ювенильными устрицами. Наиболее часто используемые размеры сит для личинок гигантской устрицы: 45, 56, 80, 150, 180 и 320 мкм. При необходимости их диапазон может быть расширен.

### 3.1.3.1. Проточный метод выращивания личинок

В некоторых зарубежных питомниках применяется проточный метод выращивания личинок с целью сокращения трудозатрат [Helm et al., 2004]. При таком методе выращивания используются специальные резервуары достаточно большого объёма, чтобы обеспечить личинкам необходимое количество пищи. Проток воды через резервуар должен компенсировать поступление в воду метаболитов личинок. Однако и при такой технологии периодически возникает необходимость чистки внутренних поверхностей резервуара. В зависимости от плотности посадки личинок, проток регулируется таким образом, чтобы общая суточная пропускная способность была равна или превышала общий объём резервуара, который необходим при культивировании с нормальной плотностью посадки. Например, если личинок обычно выращивают при плотности посадки 5 тыс. лич.·л<sup>-1</sup> в ёмкости объёмом 500 л, то при проточном выращивании в резервуаре того же объёма, но при плотности 20 тыс. лич.·л<sup>-1</sup> (т. е. в 4 раза выше) минимальная пропускная способность должна составить 2000 л в сутки. Личинки при этом удерживаются в резервуаре с установленным фильтром и планктонным газом подходящего размера, а корм подаётся с помощью перистальтического насоса. Скорость поступления корма в резервуар зависит от плотности посадки личинок и их размера.

Проточная культура позволяет сократить объём работ: обмен воды происходит непрерывно без участия человека, при этом плотность посадки личинок – высокая. Однако этот метод является расточительным, так как используются большие объёмы культивируемых микроводорослей. Кроме того, отсутствует возможность регулярного контроля роста и выживаемости личинок. При проточном методе выращивания наблюдается большой разброс размеров личинок, что влияет на синхронность их оседания.

### 3.1.4. Питание личинок и спата устриц

При выращивании личинок в питомнике ФИЦ ИнБЮМ температуру воды в течение всего периода выращивания поддерживают на уровне +21...+23 °С, что соответствует температуре, при которой происходит размножение и развитие личинок в природных условиях. Личинок устриц необходимо начинать кормить на 2-й день после оплодотворения. К этому времени у них уже развита пищеварительная система, а до этого времени они используют запас питательных веществ яйцеклетки. Личинки на стадии D-велигера уже способны самостоятельно питаться. В некоторых питомниках за 12 ч до достижения стадии D-велигера в ёмкости с эмбрионами добавляют небольшое количество водоросли *Chaetoceros muelleri* (на стационарной фазе роста).

Состав корма для личинок устриц на разных стадиях развития подбирается с учётом морфометрических особенностей водорослей, их усвояемости и калорийности.

На стадии раннего велигера именно размер клеток водорослей является главным фактором в подборе пищи личинок.

Положительная корреляция размера личинок с размерами водорослей на стадии велигера показывает, что потребление водорослей происходит только в том случае, если размер клеток соответствует размеру рта и пищевода. Прежде чем водоросли заглатываются личинками, они захватываются ресничками велума и переносятся в ротовое отверстие, а затем поступают в пищевод. Этот механизм свидетельствует о взаимодействии ресничек и пищи, что приводит к выбору подходящих клеток водорослей. Поэтому на стадии велигера в качестве корма используют водоросли *I. galbana* или *M. lutheri* в концентрации 50–100 тыс. кл.·мл<sup>-1</sup>. Размер клеток составляет около 6 мкм, и они легко заглатываются личинками. Водоросли быстро перевариваются, т. к. имеют тонкую клеточную оболочку. Личинки устриц возраста 3–4 сут. переваривают клетки *I. galbana* за 8–10 ч, а 7–8-суточные – в течение 2–3 ч. Плотность посадки 20 тыс. лич.·л<sup>-1</sup> является оптимальной для роста личинок на стадии раннего велигера. Стадия велигера продолжается 6–9 сут. при среднесуточном приросте 10 мкм·сут<sup>-1</sup>.

На стадии великонхи (9–12-е сутки) корм состоит из смеси микроводорослей *I. galbana* + *C. calcitrans* в соотношении клеток 1:1 при суммарной концентрации 150 тыс. кл.·мл<sup>-1</sup>. Размеры клеток водорослей не превышают 8 мкм, клетки имеют тонкую оболочку, что делает их доступными для усвоения. Личинкам на ранних стадиях развития требуется высокобелковая диета, а при корме, обеднённом белками, увеличивается потребление кислорода и замедляется их темп роста. Микроводоросли *I. galbana* и *C. calcitrans*, находящиеся на экспоненциальной фазе роста, содержат максимальное количество белка – 49,8 % и 40,35 % соответственно. Максимальный среднесуточный прирост личинок при таком корме – 21,1 мкм·сут<sup>-1</sup>. Темп роста и выживаемость личинок на монодиете из изохризиса или хетоцероса значительно ниже, чем на смешанной диете. Монокультуры, как правило, имеют ограниченный состав питательных веществ, поэтому для удовлетворения пищевых потребностей личинок необходимо использовать смешанные водорослевые диеты. На 14-е сутки выращивания личинок в состав корма следует добавить *P. tricornutum*, размер клеток которого – 8–10 мкм, а максимальное содержание белка – 40,7 %.

На стадии великонхи (возраст 17 сут.) задаётся плотность посадки личинок 10 тыс. лич.·л<sup>-1</sup>, а затем – 5 тыс. лич.·л<sup>-1</sup>; суммарная концентрация водорослей – 200 тыс. кл.·мл<sup>-1</sup>. Среднесуточный прирост личинок – 15–19 мкм·сут<sup>-1</sup>.

На 17–18-й день выращивания, когда размеры личинок превышают 350 мкм (стадия педивелигера), состав диеты дополняют микроводорослью тетраселмис (*T. suecica*). Корм состоит из водорослей *I. galbana* + *C. calcitrans* + *P. tricornutum* + *T. suecica* в соотношении клеток 2:1:1:1 и суммарной концентрации 200 тыс. кл.·мл<sup>-1</sup>. На 20-е сут. выращивания в состав корма вводится зелёная водоросль дуналиелла (*D. viridis*), содержащая до 19,7 % β-каротина, который способствует повышению темпа роста и выживаемости личинок. Продолжительность стадии педивелигера составляет 3 сут.

Для успешного прохождения метаморфоза и оседания личинок устриц на субстрат необходимо, чтобы в состав корма входили водоросли с высоким содержанием липидов, поэтому состав корма дополняется криптофитовой водорослью родомонас (*R. salina*) и диатомовой – скелетонема (*S. costatum*). Водоросли находятся на стационарной фазе роста и содержат максимальное количество липидов: *R. salina* – 41 %, *S. costatum* – 27 %. Включение этих микроводорослей в состав корма сокращает период оседания личинок.

Микроводоросли, используемые в качестве корма, различаются по калорийности (табл. 2). Наиболее калорийными являются изохризис, хетоцерос, скелетонема, монохризис, феодактилюм, менее калорийными – тетраселмис и дуналиелла.

**Таблица 2.** Калорийность кормовых микроводорослей и содержание в них полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК)

Вид водоросли	Калорийность, ккал·г <sup>-1</sup> (сухой вес)	Содержание ПНЖК, %	
		C20:5 n-3	C22:6 n-3
<i>I. galbana</i>	6,24	12	8
<i>C. calcitrans</i>	5,56	22	3
<i>S. costatum</i>	5,45	9	2,9
<i>M. lutheri</i>	5,24	22	10
<i>P. tricornutum</i>	4,77	20	4
<i>R. salina</i>	4,68	12	6,2
<i>T. suecica</i>	4,17	5,8	–
<i>D. viridis</i>	4,03	–	–

Жирные кислоты необходимы для роста личинок на всех стадиях развития. Аккумулированные во время планктонных стадий, они обеспечивают энергией процесс метаморфоза. Большинство гидробионтов не могут синтезировать C20:5 n-3 и C22:6 n-3 ПНЖК, поэтому скорость роста и выживаемость личинок увеличиваются, когда эти жирные кислоты содержатся в водорослях, используемых в качестве корма [Waldock, Holland, 1984].

Опыт показывает, что при избытке микроводорослей выше оптимальных значений личинки выделяют большое количество фекалий и метаболитов, что может привести к увеличению бактерий в воде. Кроме того, при избытке корма уменьшается скорость потребления личинками пищи, что отрицательно влияет на их рост и выживаемость.

### 3.1.4.1. Расчёт объёмов кормовых водорослей для личинок на разных стадиях развития

Концентрация корма для личинок устриц на ранних стадиях развития рассчитываются по общему количеству клеток водорослей на объём ёмкости с личинками при оптимальной плотности посадки.

Например, на стадии велигера корм состоит из микроводоросли *I. galbana* в суммарной концентрации 100 тыс. кл.·мл<sup>-1</sup>. Концентрация клеток *I. galbana* в культуре –  $10,1 \times 10^6$  кл.·мл<sup>-1</sup>, объём ёмкости – 100 л, отсюда объём корма личинкам равен 990 мл ( $100 \times 100 / 10,1 = 990$  мл) *I. galbana*.

На стадии великонхи состав корма *I. galbana* + *C. calcitrans*, в суммарной концентрации 150 тыс. кл.·мл<sup>-1</sup> при соотношении клеток 1:1 (75 тыс. кл.·мл<sup>-1</sup> + 75 тыс. кл.·мл<sup>-1</sup>); объём ёмкости с личинками – 100 л. Концентрация клеток культуры *I. galbana* –  $10,1 \times 10^6$  кл.·мл<sup>-1</sup>, *C. calcitrans* –  $11,22 \times 10^6$  кл.·мл<sup>-1</sup>; отсюда объём культуры *I. galbana* составит 519,8 мл ( $75 \times 100 / 10,1 = 519,8$  мл), а *C. calcitrans* – 668 мл ( $75 \times 100 / 11,22 = 668$  мл). Суточная норма потребления водорослей личинками на стадии великонхи составит 1,188 л (519,8 мл + 668 мл = 1187,8 мл = 1,188 л).

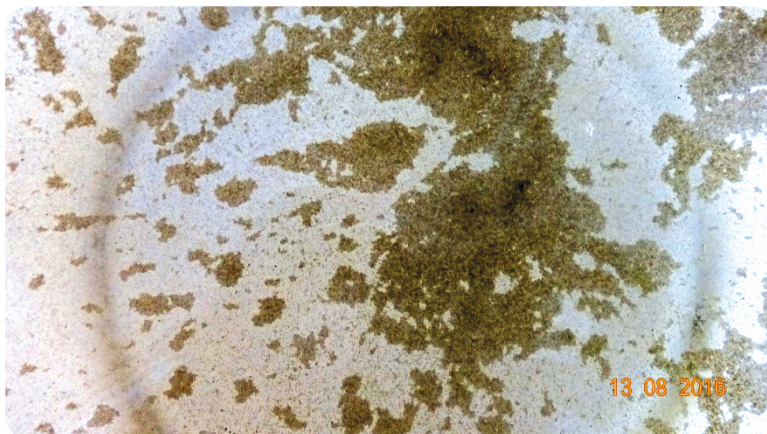
Аналогично производятся расчёты объёмов кормовых водорослей для каждой стадии развития личинок при выращивании в питомнике.

При оптимальной плотности посадки личинок корм целесообразно подавать два раза в сутки, т. е. необходимый объём водорослей делится на две равные части. Если плотность посадки личинок выше оптимальных значений, то объём водорослей необходимо увеличить соответственно и кормить дробно несколько раз в сутки. Либо разделить объём корма на две части, первую часть внести непосредственно в ёмкости, а оставшуюся половину добавлять капельным способом в течение оставшихся суток.

### 3.1.5. Метаморфоз личинок

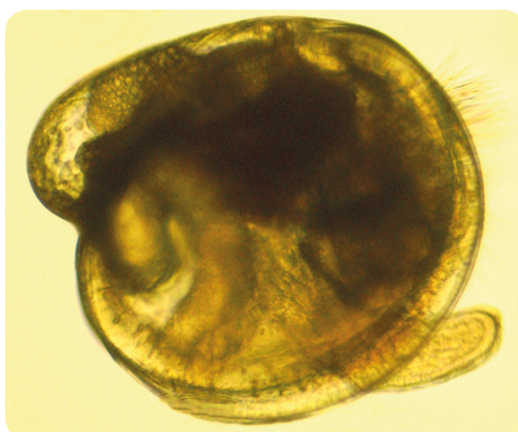
В период метаморфоза у личинок происходят значительные анатомические, морфологические и физиологические изменения. Успешный метаморфоз и выживание ювенильных особей зависит от ряда факторов, и в первую очередь от наличия запасов энергии, накопленных во время личиночных стадий. Метаморфоз может проходить быстро, но может затянуться, если не будут созданы подходящие условия. Это происходит в питомниках при понижении температуры воды.

Признак начала метаморфоза – появление у личинок пары темных пигментированных пятен – «глазков»: по одному с обеих сторон почти посередине раковины, которые видны сквозь створки. Это стадия великонхи «с глазком». Появление «глазков» зависит от размера личинок и совпадает с необычным поведением: наблюдается массовое объединение личинок при помощи слизистых выделений. В мерной ёмкости при обмене воды личинки сосредотачиваются на поверхности воды (рис. 23). Это явные признаки того, что через 3–4 дня личинки будут готовы к оседанию.



**Рисунок 23.** Личинки гигантской устрицы перед оседанием объединены и плавают на поверхности воды

Через двое суток у личинок наблюдается появление ноги (рис. 24). Нога покрыта ресничками с многочисленными сенсорными рецепторами для поиска субстрата. Личинки на этой стадии называются педивелигерами.



**Рисунок 24.** Личинка гигантской устрицы на стадии педивелигера: высота раковины 350 мкм

Они плавают с помощью велума и ползают с помощью ноги в поисках твёрдой поверхности, подыскивая подходящее для прикрепления место. Как только место найдено, устрица начинает раскачиваться вперёд-назад и влево-вправо, выпуская при этом из pedalной железы цементирующее вещество.

Затем она поворачивается на левую створку и приклеивается к капле, которая затвердевает в течение нескольких минут. С этого момента устрица остаётся прикреплённой к субстрату. После прикрепления завершается метаморфоз личинок. Нога, велум и «глазок» исчезают, развиваются жабры. Молодая устрица краем мантии секретирует раковину, которая простирается над субстратом и к нему прикрепляется.

Известно, что сигналы окружающей среды влияют на метаморфоз и личинкам требуются особые химические раздражители, инициирующие процессы расселения и метаморфоза. Исследования показывают, что этими сигналами являются природные химические вещества, называемыми нейротрансмиттерами.

Было разработано несколько методов, включая как физические, так и химические стимуляторы, инициирующие процессы оседания. Наиболее распространенным физическим методом является температурный шок. Зрелых личинок охлаждают до +8...+10 °С, а затем переносят в теплую воду (+24 °С) в ёмкости, в которых приготовлены субстраты для оседания, выдержанные в течение суток в профильтрованной морской воде.

Распространённым методом стимуляции метаморфоза является также использование химических веществ. Были испытаны химические вещества, относящиеся к нейротрансмиттерам, такие как L-ДОФА (L-3-4-дигидрокси-фенилаланин), адреналин и норадреналин [Coon, Weiner, 1985]. Эти вещества стимулируют метаморфоз личинок. Показатели роста спата обработанных и не обработанных нейротрансмиттерами личинок достоверно не отличаются.

Однако у личинок высокого качества с хорошими запасами питательных веществ и отсортированных по размерам показатели успешного метаморфоза в питомнике будут высокими.

### 3.1.6. Причины смертности личинок

Массовая смертность личинок устриц может происходить и в лучших питомниках по причине развития бактерий рода *Vibrio* [Jeffries, 1983]. Известно о доминировании в морской воде в летний период бактерий вида *V. anguillarum*. Этот вид выделяет в среду сильнодействующий экзотоксин, включающий низкомолекулярный цилиостатический токсин, который ингибирует биение ресничек велума личинок и жабр молоди. Однако вибрион *V. anguillarum* не всегда может быть причиной аномальных показателей смертности, и при этом представители рода *Vibrio* не являются единственной группой облигатных патогенов, загрязняющих культуру личинок. Потенциально патогенные виды могут присутствовать в питомнике в течение всего года, но в основном дают вспышку при высокой температуре воды (выше +24 °С).

Для исключения причины массовой гибели личинок от заболевания нужно исследовать другие возможные причины. Например, необходимо проверить чистоту трубопроводов и фильтров. Промывка фильтров пресной водой предохранит от развития микроорганизмов.

Кроме того, должны быть тщательно исследованы насосы и воздухоподдувки. Важным обстоятельством является соблюдение чистоты оборудования; в идеале необходимо иметь для каждого бака по выращиванию личинок отдельные сита, используемые для обмена воды.

Причиной смертности личинок может быть:

- загрязнение культуры водорослей;
- ошибка в расчётах концентрации микроводорослей;
- перекорм личинок;
- отсутствие аэрации;
- плохо промытые баки;
- не соблюден температурный режим при обмене воды личинкам.

Только после исключения этих всех причин можно рассматривать возможность заболевания.

Развитие болезни личинок гигантской устрицы происходит стремительно. Длительные симптомы, приводящие к массовой смертности личинок, обычно отсутствуют. Накануне вечером личинки могут выглядеть совершенно нормально с точки зрения окраски и поведения, но к следующему утру, они осядут на дно бака даже при наличии аэрации. Однако предупреждением о возможной массовой смертности может быть уменьшение потребления личинками микроводорослей. Это указывает на важность тщательного ведения записей. Если большинство личинок в баке погибли по причине болезни, то спасти остальных не представляется возможным, и их ликвидируют.

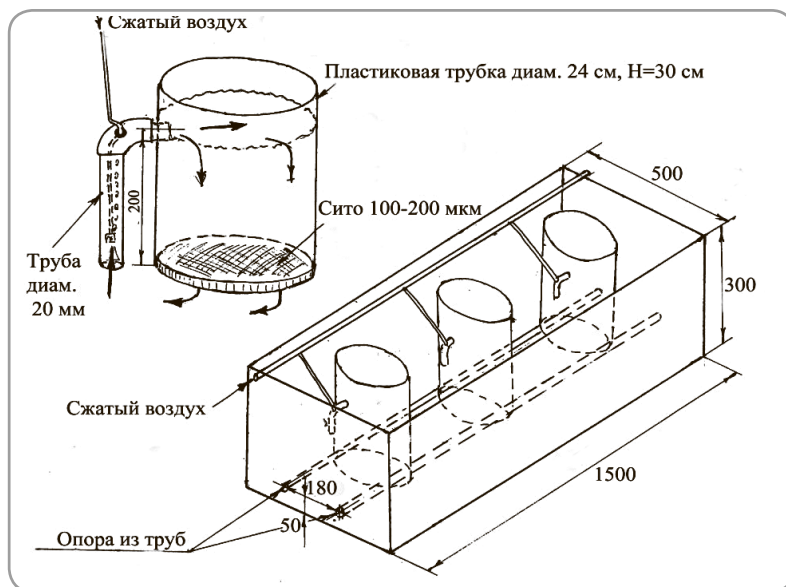
Если массовая гибель личинок наблюдается во всём питомнике, то необходимо попытаться приостановить болезнь и устранить источник инфекции. Питомник закрывают для тщательной обработки; всё оборудование очищают и стерилизуют. Во время таких вспышек использование антибиотиков не рекомендуется. Они редко улучшают ситуацию, и всегда есть риск выживания самых устойчивых микроорганизмов.

### **3.1.7. Оседание личинок гигантской устрицы**

В естественных условиях на этапе оседания происходит значительная смертность личинок. В промышленных питомниках, напротив, выживаемость педивелигеров может составлять до 90 %. Для этого требуется создать соответствующие условия: выращивание в профильтрованной морской воде, насыщенной кислородом при оптимальной температуре, при достаточном количестве качественного корма и использование подходящего субстрата для осаждения личинок.

В первых питомниках применяли разнообразные коллекторы. Постепенно всё большее распространение получила крупка, изготовленная из створок моллюсков [Robert, Gerard, 1999]. Крупка – это зёрна размером около 0,3 мм, пригодные для прикрепления только одной личинки, поэтому спат, выращенный на крупке, считается ценным посадочным материалом. В ёмкости с проточной водой устанавливают лотки с пластиковыми цилиндрами (рис. 25).





**Рисунок 25.** Устройство для осаждения личинок устриц на крупку, которая распределена на сите

Дно цилиндров затянута ситом с размером ячеей 200 мкм. На сите равномерно рассыпают крупку из устричных створок из расчёта 130 мг микроосколков на 1 см<sup>2</sup> сита. На 1 млн личинок нужно два цилиндра диаметром 500 мм, т. е. 500 тыс. личинок на цилиндр (сито). Внутренние стенки цилиндра должны быть покрыты слоем парафина. Продолжаются поиски новых типов коллекторов, которые в большей степени пригодны для оседания личинок и соответствуют требованиям технологии выращивания. Примером последнего достижения технологии может служить аппарат для осаждения личинок в восходящих потоках воды (на жидкий субстрат).

Известно, что у личинок устриц на стадии педивелигера может проходить метаморфоз без прикрепления на субстрат под воздействием нейротрансмиттера, так называемого эпинефрина [Coon, Weiner, 1985]. Для этого 0,1832 г адреналина растворяют в небольшом объёме 10%-ного раствора соляной кислоты, и затем его добавляют в 10 л профильтрованной морской воды. Такая концентрация рассчитана на стимуляцию метаморфоза 2 млн педивелигеров в течение 60–90 мин.

Затем личинок промывают и возвращают в баки для выращивания. При следующей смене воды можно наблюдать, что личинки, у которых прошёл метаморфоз, отличаются по размерам и форме раковины от тех, у которых метаморфоз не прошёл (личинки, не прошедшие метаморфоз, задерживаются на сите с размером ячеей 270 мкм). Следует отметить, что только готовые к оседанию личинки отвечают на обработку нейротрансмиттером и завершают метаморфоз без прикрепления. При этом показатели выживаемости спата устриц составляют от 50 до 70 %. Таким образом, непрерывный поиск методов осаждения педивелигеров устриц может привести к полному отказу от использования коллекторов.

### 3.1.7.1. Проведение осаднения личинок в питомнике ФИЦ ИнБЮМ

Технология производства спата в первых небольших черноморских питомниках, несомненно, будет включать этап проведения осаднения личинок на коллекторы. Всё оборудование, которое будет использоваться при оседании личинок, должно предварительно в течение двух месяцев вымачиваться в морской воде. Процесс осаднения проводится в ваннах либо в бассейнах разного объёма, в которых подвешены коллекторы.

В питомнике ФИЦ ИнБЮМ за сутки до проведения оседания личинок, готовят ванны, объём которых заполняют коллекторами, заливают профильтрованной морской водой и устанавливают аэрацию. Коллекторы должны покрыться бактериальной пленкой до начала оседания личинок. Через сутки воду в ёмкостях полностью меняют, добавляют корм, доводя его до концентрации 250 тыс. кл.·мл<sup>-1</sup>, и равномерно по всему объёму распределяют личинок. Максимальное количество вносимых личинок – 1 млн экз.·м<sup>-3</sup>. Аэрацию снижают до минимума. Очень важно обеспечить продувку всего объёма воды мелкими пузырьками воздуха. Дело в том, что локальная (точечная) продувка вызывает отдельные достаточно мощные потоки воды, приносящие личинок к коллекторам, установленным на пути течения. Эти коллекторы оказываются перенаселёнными личинками, в то время как на других коллекторах личинок слишком мало.

На второй день воду не меняют, концентрацию корма увеличивают до 300 тыс. кл.·мл<sup>-1</sup>; весь объём дневного корма разделяют на две части и выдают дважды – в начале и конце рабочего дня. Коллекторы переворачивают нижней стороной вверх для лучшего оседания и распределения личинок. Оседание завершается через трое суток.

Дорастивают спат на коллекторах в питомнике в течение 21 сут. в непроточной профильтрованной воде. Воду меняют через сутки. Концентрацию корма увеличивают до 500 тыс. кл.·мл<sup>-1</sup>. Среднесуточный прирост спата составляет 110–190 мкм.

### 3.1.8. Питание спата гигантской устрицы в питомнике

Объём корма для спата устриц, выращиваемого в питомнике, можно рассчитать по общему количеству клеток водорослей на объём ванны. Например, корм состоит из микроводорослей *I. galbana* + *P. tricornutum* + *C. calcitran* + *T. suecica* + *R. salina* + *S. costatum* в соотношении клеток 2:2:1:1:1:1, суммарная концентрация – 500 тыс. кл.·мл<sup>-1</sup>. Подсчитывают объём каждого вида водоросли, как указано для личинок (см. подраздел 3.1.4.1), затем полученные результаты суммируют; это будет суточный объём водорослей, необходимый для потребления спатом.

Рацион для спата устриц можно также рассчитать по сухой биомассе водорослей с учётом условий их выращивания – проточная система или частичная замена морской воды (табл. 3).

Рацион для спата определяется по формуле:

$$F = (S \times R) / 7,$$

где: F – сухой вес водорослей, выдаваемых в сутки (мг);

R – рацион, сухой вес водорослей (мг) на 1 мг общего веса спата в неделю;

S – общий вес спата (мг) в начале каждой недели [Helm, et al., 2004].

**Таблица 3.** Сухой вес микроводорослей [Brown, 1991]

Вид водоросли	Сухой вес, пг·кл <sup>-1</sup>	Сухой вес 1 млн клеток, мг
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	11,3	0,01
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	76,7	0,08
<i>Skeletonema costatum</i>	52,2	0,05
<i>Tetraselmis suecica</i>	168,2	0,17
<i>Isochrysis galbana</i>	30,5	0,03
<i>Monochrysis lutheri</i>	102,3	0,10
<i>Rhodomonas salina</i>	122,5	0,12

Примечание: 1 пг =  $1 \times 10^{-9}$  мг =  $1 \times 10^{-12}$  г.

Известно, что рацион спата устриц в расчёте на сухую массу микроводорослей может изменяться в диапазоне 0,4–1,0 мг на 1 мг спата.

Пример расчёта необходимого объёма культуры водорослей (V, л), для суточного рациона спата устриц.

Если общий вес спата в начале недели составил 500 г (500 000 мг); рацион – 0,8 мг сухого веса водоросли на мг общего веса спата, рассчитанный на неделю; корм – *T. suecica*, концентрация клеток – 1 500 000 кл·мл<sup>-1</sup>, то:

$$F = (500\ 000 \times 0,8) / 7 = 57\ 143 \text{ мг, или } 57,143 \text{ г (сухого веса водоросли).}$$

Отсюда: ежедневный рацион спата устриц общим весом 500 г равен 57,143 г сухого веса микроводорослей. Так как 1 млн клеток *T. suecica* весит 0,22 мг (сухой вес), объём суспензии культуры *T. suecica*, который необходим для рациона спата устриц, рассчитывается по формуле:

$$V = (S \times 0,8) / (7 \times W \times C),$$

где: V – объём суспензии клеток водоросли (л), необходимый для суточного рациона спата;

W – вес 1 млн клеток кормовых водорослей;

C – концентрация клеток этого вида водоросли (кл·мл<sup>-1</sup>).

$$\text{Отсюда: } V = (500\ 000 \times 0,8) / (7 \times 0,22 \times 1\ 500\ 000) = 0,173 \text{ л} = 173 \text{ мл.}$$

Следовательно, для спата устриц общим весом 500 г необходимо ежедневно выдавать по 173 мл микроводоросли *T. suecica* концентрации 1,5 млн кл·мл<sup>-1</sup>.

Корм для спата состоит из нескольких видов водорослей, поэтому весь рацион – 0,8 мг (общий сухой вес) – следует разделить на количество видов водорослей, а затем с учётом сухого веса каждого определить общий объём смеси водорослей.

### **3.1.9. Телекаптаж**

Питомник может поставлять на фермы не только спат, но и личинок, используя для этого метод телекаптажа. Метод телекаптажа был разработан и применён в США в 1982 г. в Кембридже (Horn Point, Environmental Laboratories), а затем был распространён в Канаде и Западной Европе. Это техника дистанционного переноса личинок устриц на стадии педивелигера, полученных в питомниках, с последующим проведением их осаднения (каптажа) на коллекторы, расположенные в бассейнах фермерских марихозяйств [Joly et al., 1989; Coatanea et al., 1991].

Предварительными исследованиями было показано, что личинки тихоокеанских устриц с развитыми «глазками» остаются живыми в течение недели во влажном состоянии без воды при температуре +5...+10 °С, что не влияет на их выживаемость после оседания. Таким образом, был разработан способ перевозки личинок тихоокеанских устриц на стадии педивелигера на значительные расстояния, буквально в любую точку мира. Фермер мог купить таких личинок устриц в питомнике, когда это было для него удобно, отправить их на своё предприятие для дальнейшего выращивания. Телекаптаж преодолел недостатки предыдущих методов, в частности необходимость закупки спата и расходы на обработку и выращивание прикреплённой молодежи.

Принцип телекаптажа заключается в том, что личинок на стадии педивелигера (возраст до трёх недель) собирают на фильтр, заворачивают в стерильную влажную холщевую ткань и помещают в специальную упаковку (контейнер), в которой их перевозят на устричные хозяйства. Высота раковины и диаметр «глазка» могут быть использованы в качестве критериев оценки пригодности педивелигеров для перевозки при низкой температуре. Критическое значение высоты раковины составляет 350 мкм, а диаметр «глазка» – 14 мкм. Вместе с личинками отправляют и кормовые микроводоросли в виде пасты.

Получение и контроль качества личинок. Личинок поставляют в изотермических ящиках, в которые вкладывают пакеты со льдом (или другим охладителем), чтобы температура за время пересылки поддерживалась в пределах от +5 до +10 °С. Личинки находятся на фильтре (планктонном газе), завёрнутом во влажный холст для предохранения их от высыхания.

После получения личинок следует проверить их качество и соблюдение технических условий пересылки:

- температура в посылке должна находиться в пределах +5...+10 °С;
- цвет личинок должен быть от тёмно-коричневого до чёрного;

- запах должен отсутствовать;
- проверить плавательную активность личинок. Поместить несколько личинок, взяв, например, на кончике ножа, в сосуд с водой (+20...+25 °С). Через несколько минут можно увидеть, как они начнут плавать. Если по истечении часа личинки не будут плавать, можно считать их качество неудовлетворительным.

При возникновении непредвиденных обстоятельств, или если не всё оборудование ещё готово, можно отложить проведение процесса оседания на сутки. Для этого необходимо поместить личинок в фирменную упаковку и поставить в нижний отдел холодильника. Строгое выполнение рекомендаций по проведению телекаптажа, является залогом получения хороших результатов.

Для проведения телекаптажа требуется следующее оборудование:

- Две ванны (примерно на 1000 л).
- Термоизоляционный материал (пенопласт).
- Две установки регулируемого подогрева воды (мощностью 500–1000 ватт).
- Система аэрирования (аквариумные мембранные насосы или воздуходувка, распылители воздуха).
- Насос (для наполнения ванн).
- Фильтр для морской воды, диаметр пор – 10–25 мкм.
- Цилиндры диаметром 500 мм с ситом с размером ячеек 200 и 500 мкм.
- Эрлифт: трубка-распылитель длиной 50 мм.
- Парафин для покрытия внутренней поверхности цилиндров.
- Подставки под сито и цилиндры.
- Крупка из раковин мидий и устриц, размер – 250–300 мкм.
- Термометр.

*Дополнительное оборудование.* Одно проградуированное ведро на 10 л, используемое только для телекаптажа; пипетка на 1 мл; 1 лупа; 1 маленькая губка; 1 большая губка; сита с диаметром ячеек 200 и 300 мкм для сортировки крупки; сита на 400 и 700 мкм для сортировки спата устриц.

*Сборка оборудования.* Новое оборудование (цилиндры, трубки, уголки, ванны и т. д.) необходимо предварительно выдерживать как минимум в течение двух месяцев в морской воде (с регулярной её сменой) для вымывания из них токсичных для личинок веществ. Непосредственно перед работой оборудование должно быть тщательно вымыто пресной водой и высушено.

Для предотвращения интенсивного оседания личинок на стенки цилиндра, его покрывают расплавленным парафином, нанося тонкий слой с помощью кисти. Опыт показывает, что парафин отлипает через несколько дней, но личинки к тому времени успевают прикрепиться к субстрату.

*Подготовка крупки.* Крупка, отсортированная через сито с размером ячеек от 200 до 300 мкм, должна быть промыта в пресной воде для удаления очень мелких частиц. Крупку подготавливают за несколько недель до телекаптажа; после промывки её высушивают и хранят в сухом виде.

В отличие от каптажа на коллекторы, каптаж на крупку не требует выдерживать её длительное время в морской воде. Достаточно рассыпать крупку на сито и оставить на ночь (перед проведением оседания) в профильтрованной морской воде. Отметим, что некоторые фирмы, поставляющие личинок, рекомендуют выдержать крупку в морской воде в течение трёх дней. На один цилиндр диаметром 500 мм требуется 250 г крупки.

*Подготовка к оседанию (каптаж).* За сутки до начала каптажа необходимо заполнить ванну профильтрованной морской водой через фильтр с порами 10 мкм. Солёность воды должна быть близкой к солёности воды в питомнике поставщика. Температура воды в ванне должна быть в пределах +23...+25 °С; оптимальная температура – +24 °С. Цилиндры с ситом должны быть установлены в ванне в толще воды (см. рис. 25).

Следует проследить, чтобы температура воды была одинаковой во всех частях ванны и хорошо налажена аэрация, которая не допускала бы попадания пузырьков под сито. Для этого включают систему аэрирования (эрлифт), что обеспечит хорошую циркуляцию воды и равномерное распределение температуры. Можно сделать небольшие отверстия по нижнему краю цилиндра, через которые будет уходить воздух.

Если ванна оборудована автоматическим подогревом, то датчик температуры должен находиться на удалении от нагревателя и вблизи от поверхности.

*Акклиматизация личинок.* Личинки упакованы в изотермические ящики (+5...+10 °С), поэтому их надо акклиматизировать к температуре морской воды. Для этого холст с личинками, помещённый в пластиковый пакет, следует оставить на воздухе на 20 мин. Затем личинок необходимо перенести в 10-литровое ведро, наполовину заполненное морской водой при температуре +18...+20 °С. Через 30 мин. долить водой температуры +23...+25 °С. Выдержать 10 мин. и долить воды доверху.

*Подсчёт.* Перемешать рукой весь объём воды в ведре, двигая энергично ладонь в вертикальном направлении. Взять 6 раз пипеткой на 1 мл пробы воды с личинками и вылить их на фильтровальную бумагу. С помощью лупы подсчитать количество личинок в каждой пробе. Общее количество личинок определяется как среднее значение, умноженное на 10 тыс.

*Проведение оседания личинок.* Распределить личинок по всем цилиндрам с помощью небольшого стакана, перемешивая аккуратно содержимое ведра. На 1 млн личинок нужны два цилиндра диаметром 500 мм, т. е. по 500 тыс. личинок на каждый цилиндр. Возможно, что личинки будут склеиваться, образуя тяжёлые комки, что приводит к ошибкам при подсчёте. Однако это не является показателем плохого качества личинок. Накрыть ванну крышкой из полистирола, т. к. личинки во время прикрепления избегают света.

Аэрацию включить примерно на тридцать минут, чтобы обеспечить тщательное перемешивание личинок в аквариуме, а затем выключить, чтобы позволить личинкам прикрепиться к субстрату. Личинки устриц прикрепляются к субстрату в течение 24 ч с момента переноса их в ёмкости.

*Смена воды.* Воду в сосудах с личинками не меняют в течение первых двух дней оседания. Затем следует включить медленный проток морской воды, профильтрованной через песчаный фильтр. Этот проток необходим для адаптации спата к местным условиям окружающей среды, а также для поступления природного фитопланктона. Однако при внесении культивируемого корма, этот проток следует отключить.

При отсутствии проточной системы, полная смена воды должна осуществляться ежедневно, начиная с третьего дня после перенесения личинок в ёмкости. Это необходимо для удаления продуктов метаболизма личинок и остатков кормовых водорослей.

В идеале, нужно использовать запасную ванну с профильтрованной водой той же температуры, как и в основной ванне. Цилиндры с личинками переносят в запасную ванну. Но при этом необходимо отмыть и прополоскать сита с личинками, цилиндры, трубки и т. д., а также устриц, которые могут прикрепляться друг к другу.

Промыть освободившуюся ванну, а затем прополоскать её морской водой. Наполнить вымытую ванну профильтрованной морской водой. Включить систему подогрева воды, для того чтобы на следующий день можно было перенести личинок в воду аналогичной температуры.

*Питание.* Кормят личинок водорослевой пастой либо диатомовой водорослью скелетонема (*S. costatum*), культивируемой в больших объёмах.

Водорослевая паста. Некоторые питомники реализуют корм для личинок в виде водорослевой пасты (микроводоросли, сконцентрированные с помощью центрифуги), которая хорошо хранится в холодильнике.

Во время приобретения необходимо знать её концентрацию (количество клеток микроводоросли на грамм пасты; обычно это  $2 \times 10^9$  клеток в 1 г пасты). Приводим дневные дозы корма в виде пасты, необходимой для 1 млн личинок (табл. 4).

#### **Перед подачей пасту готовят следующим образом:**

- отбирают необходимое количество (в г);
- растворяют в морской воде, взятой из ванны;
- перемешивают, пока окраска суспензии не станет гомогенной, и распределяют по всей ванне.

**Таблица 4.** Суточные дозы выдачи корма (водорослевая паста) личинкам устриц

Дни	Частота в день	Вес пасты, г
1	2	30
2	2	30
3	2	45
4	2	60
5	2	75
6	2	80

Использование водоросли *S. costatum*. В табл. 5 представлены суточные дозы культуры водоросли *S. costatum* при концентрации 1,5 млн кл. · мл<sup>-1</sup>, выдаваемые 1 млн личинок.

**Таблица 5.** Суточные дозы выдачи корма (водоросль *Skeletonema costatum*) личинкам устриц

Дни	Частота в день	Объём, л
1	2	40
2	2	40
3	2	60
4	2	80
5	2	100
6	2	120

Выдача корма производится 2 раза в сутки: утром, после смены воды, и вечером. Первая выдача корма осуществляется через 0,5–1 ч после переноса личинок. После внесения корма вода должна быть коричневой и постепенно становиться прозрачной ко второму кормлению.

*Продолжительность телекаптажa.* Для полного оседания личинок достаточно 24–48 ч. По истечении 5–7 сут. при температуре +25 °С спат достигает размеров 400–600 мкм. Через 5 сут. с помощью сита с размером ячеек 400 мкм отделяют устриц от оставшейся крупки и от мёртвых личинок.

Нельзя проводить сортировку личинок и спата через сито ранее, чем через 48 ч (в этом случае неизбежны потери личинок), и позже, чем через 5 дней (спат может начать срастаться между собой). Для адаптации спата перед перенесением в проточные ванны необходимо заранее (в течение 24–48 ч) предусмотреть понижение температуры воды в цилиндрах и удалить слабо растущих устриц (примерно 5 % общего количества).



*Подращивание спата в питомнике.* Спат устриц продолжают подращивать в ванне (цилиндрах) в течение 7–8 дней при температуре +25 °С до тех пор, пока они не достигнут размера 800–1000 мкм. Через неделю примерно 50 % спата устриц задерживается на сите 700 мкм, что позволяет разделить их по размерам на две группы. В течение этого периода ежедневная норма корма (при начальном количестве личинок 1 млн) составляет 120–130 л *S. costatum* (концентрация 1,5 млн кл.·мл<sup>-1</sup>) или 95–100 г пасты.

Выращивание спата в проточных ваннах. Устриц, достигших размера 800–1000 мкм, переносят в цилиндры диаметром 500 мм, с размером ячеей сита 500–600 мкм. Плотность посадки – 200–400 тыс. экз. на цилиндр. Вода в проточных ваннах проходит сквозь цилиндры сверху вниз. На выходе из ванны нужно предусмотреть фильтр, чтобы не допустить потери спата устриц.

Продолжительность подращивания спата в ёмкостях зависит от температуры воды. Ранней весной и поздней осенью это может быть более месяца, но летом продолжительность может составить одну неделю. Цилиндры и сита необходимо ежедневно промывать водой до тех пор, пока спат устриц достигнет размеров 2–3 мм, затем это делать через день. Сортировку устриц по размерам проводить каждые 5 дней, формируя одноразмерные группы. В процессе роста спат надо пересаживать в цилиндры с большими размерами ячеей сита.

Спат выращивают в ёмкостях до 2–3 мм (иногда – до 10 мм), затем его переносят в садки на дорощивание в море. Переносить следует рано утром или поздно вечером, при понижении температуры воздуха. Время, необходимое для этой процедуры, должно быть сведено к минимуму, чтобы уменьшить стресс и смертность спата.

*Подсчёт осевших личинок и спата.* Первый подсчёт обычно выполняют через три недели после начала работы с личинками, когда спат задерживается на сите с размерами ячеей 1250–1500 мкм. Подсчёт определяется следующим образом: 2–3 выборки спата устриц по 500 экз., взвешивают на весах с точностью до сотой грамма и определяют средний вес 1 экземпляра. Затем взвешивают всех устриц и рассчитывают их количество, после чего определяют выживаемость.

В питомнике во время оседания личинок выживаемость обычно составляет 55–60 %, а после подращивания спата – 45–50 %. В процессе оседания около 5 % устриц могут срастаться друг с другом.

### **Преимущества телекаптажа:**

- Выбор наиболее удачного периода для проведения работ.
- Лучшее использование ресурсов природной среды, например использование в весенний период морской воды, богатой фитопланктоном.
- Удобство и дешевизна транспортировки живого материала (личинки находятся вне воды; посылка занимает незначительный объём).
- Получение корма вместе с посылкой.
- Возможность проведения селекции спата по темпу роста.

Важным преимуществом при перевозке личинок, а не молоди, является то, что личинок выращивают в профильтрованной морской воде с соблюдением санитарно-эпидемиологических нормативов. При этом опасность распространения болезней или паразитов практически исключается по сравнению с доставкой спата, выращенного в природных условиях.

Поскольку в Чёрном море личинок гигантской устриц можно получать только в питомниках, телекаптаж может быть важным способом расселения устриц по марихозяйствам. Строительство одного-двух мощных питомников позволит обеспечить все устричные фермы качественным посадочным материалом.

### 3.2. Культивирование одноклеточных водорослей

Живые водоросли являются единственным полноценным кормом для личинок и молоди двустворчатых моллюсков. Важным аспектом успешного функционирования питомника является подбор и культивирование разных видов микроводорослей, необходимых для роста и метаморфоза личинок. Культивирование микроводорослей в питомнике вызвано тем, что численность клеток фитопланктона в морской воде недостаточна для роста личинок и спата, выращиваемых в питомнике при высокой плотности посадки.

Спектр питания личинок гигантской устрицы должен включать несколько видов микроводорослей, относящихся к разным таксонам (жгутиковые и диатомовые), отличающихся по размерам и биохимическому составу (содержание белка, углеводов, липидов). В экспериментальном питомнике ФИЦ ИнБЮМ в качестве корма используются 10 видов микроводорослей (табл. 6).

В состав корма личинкам устриц необходимо включать и зелёную водоросль хлорелла (*C. vulgaris*, размер клеток 4–5 мкм), как природный антибиотик. Водоросль синтезирует антибиотическое вещество «хлореллин», уничтожающее патогенную микрофлору, что способствует укреплению иммунитета личинок. Поэтому при выращивании личинок устриц в экспериментальном питомнике ФИЦ ИнБЮМ антибиотики не используются.

Однако в зарубежных промышленных питомниках для предотвращения высокой смертности личинок от невыясненных причин применяют антибиотики широкого спектра действия, например, Chloramphenicol в концентрации 2–5 мг·л<sup>-1</sup>.

В зависимости от мощности питомника число культивируемых видов можно уменьшить до 4–5, но обязательно в состав корма должны входить *I. galbana*, *P. tricornutum*, *C. calcitrans*, *T. suecica*, *C. vulgaris*, и желателен – *R. salina* (см. подраздел 2.2.4.).

**Таблица 6.** Микроводоросли, используемые в качестве корма для личинок устриц, выращиваемых в питомнике ФИЦ ИнБЮМ

Вид водоросли	Размер клетки d – h, мкм	Объём клетки, мкм <sup>3</sup>	Сухой вес, пг·кл <sup>-1</sup>
<b>Жгутиковые</b>			
<i>Isochrysis galbana</i>	5,9 – 4,4	39,2 ± 5,2	30,5
<i>Monochrysis lutheri</i>	3,0 – 2,1	13,8 ± 4,2	22,4
<i>Tetraselmis suecica</i>	11,5 – 8,3	505,3 ± 14,7	168,2
<i>Tetraselmis viridis</i>	8,5 – 7,6	214,4 ± 21,1	102,8
<i>Dunaliella viridis</i>	11,1 – 8,1	313,5 ± 0,2	99,9
<i>Rhodomonas salina</i>	12,2 – 7,3	527,1 ± 0,4	122,5
<b>Диатомовые</b>			
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	9,2 – 4,2	521 ± 12,0	11,3
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	2,5 – 10,1	113,0 ± 13,1	76,7
<i>Skeletonema costatum</i>	9,1 – 6,2	254,1 ± 10,1	52,2

Примечание: d – длина клетки; h – высота клетки; пг = 10<sup>-12</sup> г.

### 3.2.1. Факторы, влияющие на рост микроводорослей

Наиболее важными факторами, влияющими на скорость роста культивируемых водорослей, являются количество минеральных веществ в питательной среде, освещённость, температура, pH среды и аэрация.

*Питательная среда.* В питомнике ФИЦ ИнБЮМ микроводоросли выращивают на питательных средах Конвея и F/2, которые приготовлены на стерильной морской воде, обогащённой минеральными веществами: нитратами, фосфатами, микроэлементами и витаминами.

Жгутиковые водоросли необходимо культивировать на среде Конвея [Lanapan et al., 2013]. Для роста диатомовых водорослей требуется кремний, поэтому целесообразно использовать среду F/2 или F [Guillard et al., 1975].

Маточные растворы для приготовления питательных сред, готовят на дистиллированной воде и хранят в холодильнике.

Состав среды Конвея (в собственной модификации):

NaNO<sub>3</sub> – 200,0 г;

MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O – 0,72 г;

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O – 40,0 г;

FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O – 5,20 г;

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 67, 2 г;

ЭДТА (трилон Б) – 90,0 г.

Соли растворить в 1,5 л дистиллированной воды, добавить 2 мл раствора микроэлементов и довести до 2 л дистиллированной водой.

Приготовление раствора микроэлементов:

$\text{ZnCl}_2$  – 2,1 г;

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 2,0 г;

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 0,9 г;

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 2 г;

$\text{H}_2\text{O}$  дист. до 100 мл.

Рабочий раствор питательной среды: к 1 л стерильной морской воды добавить 1 мл среды Конвея.

Состав среды Guillard F/2 [Guillard et al., 1975]:

$\text{NaNO}_3$  – 75 г/л;

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 5 г/л;

$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  – 30 г/л;

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 3,50 г/л;

$\text{Na}_2\text{ЭДТА}$  – 4,36 г/л.

Соли растворить в 900 мл дистиллированной воды.

Приготовить раствор микроэлементов:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,98 г/100мл;

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 2,20 г/100мл;

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 1,00 г/100мл;

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 18,00 г/100мл;

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,63 г/100мл.

По 1 мл каждого раствора микроэлементов добавить к 900 мл раствора основных солей и довести дистиллированной водой до 1 л.

Витамины:

$\text{B}_1$  – 1 мг;  $\text{B}_{12}$  – 1 мг;  $\text{B}_6$  – 20 мг.

Витамины растворить в 1 л дистиллированной воды; отобрать 0,5 мл раствора витаминов и добавить к 1 л рабочего раствора.

Рабочий раствор питательной среды: к 1 л стерильной морской воды добавить 1 мл среды F/2.

*Освещённость.* Освещённость играет важную роль при культивировании микроводорослей. Свет – это источник энергии для фотосинтеза, который включает совокупность процессов поглощения, превращения и использования энергии квантов света в различных химических реакциях, в том числе превращения углекислого газа в органические вещества.

Содержание белка, углеводов, пигментов, ненасыщенных жирных кислот, изменяется в зависимости от интенсивности света. Избыток света, так же как и недостаток, может быть причиной серьезных нарушений развития водорослей. С одной стороны, свет способствует росту водорослей и накоплению биомассы, с другой стороны, свет высокой интенсивности может вызвать фотоокислительный стресс, который приведёт к фотоингибированию и гибели клеток.

Именно поэтому при культивировании водорослей в питомнике очень важно определить оптимальный диапазон освещённости.

Источником света могут служить лампы дневного света Philips TLD 36 W/965 (белый свет). Диапазон освещённости изменяется в зависимости от концентрации клеток в культуре и типа культиватора. Для колб объёмом 2–5 л достаточно интенсивности света 2–5 кЛк. При увеличении объёмов культиваторов от 20 до 100 л интенсивность света необходимо увеличить до 10–15 кЛк. Очень высокая интенсивность света (> 15 кЛк) может привести к нагреву культуральной среды и гибели клеток. Продолжительность искусственного освещения должна быть не меньше 18 ч в сутки (табл. 7).

**Таблица 7.** Оптимальные параметры условий культивирования микроводорослей в питомнике

Факторы	Оптимальные значения
Температура, °С	+18...+24
Освещённость, кЛк	5–15
Фотопериод (день:ночь), ч	18:6 или 24:0
pH	7,5–8,5

Если при массовом культивировании микроводорослей предусмотрено круглосуточное освещение, то необходимо строго соблюдать температурный режим.

*pH среды.* Для большинства культивируемых видов водорослей pH находится в диапазоне 7,5–8,5. Повышение pH до значений > 9 приводит к нарушению жизненных процессов в клетках водорослей и к их гибели. Для поддержания оптимальных значений pH в культуральной среде применяется аэрация. При низкой плотности культуры достаточно аэрации воздухом. Если в культуре большая концентрация клеток, то необходимо барботирование смесью воздуха и углекислого газа.

*Аэрация* также применяется для предотвращения оседания водорослей. Необходимо, чтобы все клетки культуры были равномерно освещены и получали питательные вещества. В воздухе содержится 0,04 % CO<sub>2</sub>, и этого количества достаточно для процесса фотосинтеза в культурах с низкой концентрацией клеток, наращиваемых в небольших объёмах.

Для увеличения биомассы микроводорослей в культиваторах больших объёмов аэрация должна осуществляться газовой воздушной смесью, содержащей до 2 % углекислого газа. Для очистки газовой воздушной смеси при культивировании кормовых микроводорослей используются мембранные фильтры с диаметром пор до 0,2 мкм.

### 3.2.2. Процесс культивирования микроводорослей

Культивирование микроводорослей в питомнике ФИЦ ИнБЮМ начинается с очистки морской воды. Вода проходит через фильтры-картриджи с диаметром пор  $20 \rightarrow 10 \rightarrow 5 \rightarrow 1$  мкм (рис. 26). После этого морская вода подвергается термической или химической стерилизации и используется для приготовления питательных сред при культивировании микроводорослей.



Рисунок 26. Установка для очистки морской воды в питомнике ФИЦ ИнБЮМ

Основные этапы культивирования микроводорослей в питомнике представлены на схеме (рис. 27).

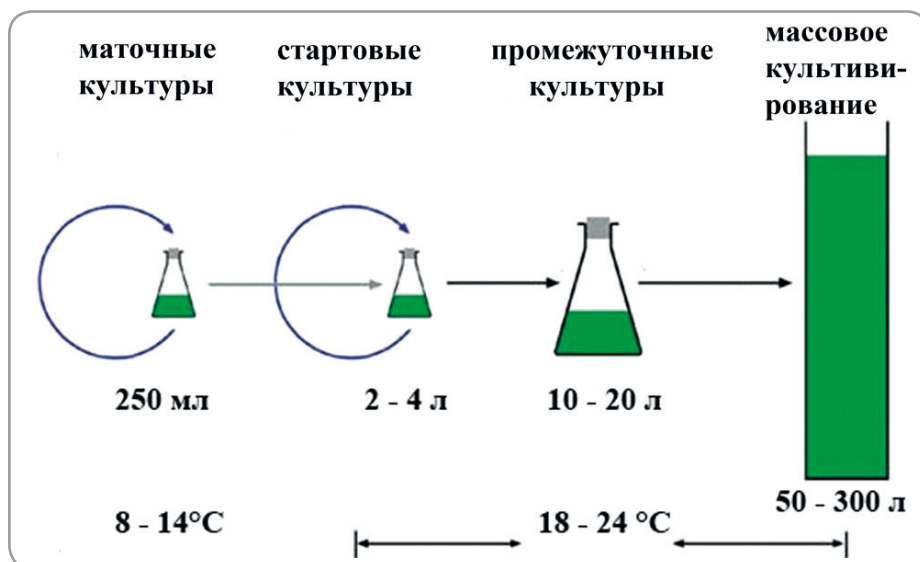


Рисунок 27. Схема культивирования микроводорослей (по материалам: Helm et al., 2004)

Маточные культуры или стерильные культуры микроводорослей могут быть получены из специализированных коллекций водорослей или выделены из фитопланктона. Коллекция кормовых видов водорослей должна храниться в стерильных условиях для того, чтобы исключить загрязнения микроорганизмами. Каждый вид водоросли содержится в колбах 100–250 мл в 2–3 повторностях при температуре +8...+14 °С. Освещение осуществляется двумя или более 8-ваттными люминесцентными лампами, которые обеспечивают интенсивности света от 500 до 1000 люкс (рис. 28).

При работе с маточными культурами (инокулят) соблюдается строгая стерильность посуды (колб, пипеток) и питательных сред. Морская вода для приготовления питательных сред должна проходить трёхразовую термическую стерилизацию при температуре +75...+85 °С либо стерилизацию в автоклаве при температуре +120 °С и давлении 1 атм в течение 20 мин.



**Рисунок 28.** Коллекция микроводорослей в питомнике ФИЦ ИнБЮМ

Пересев культур осуществляют в специальных боксах, которые перед работой стерилизуют с помощью бактерицидных ламп в течение 20–30 мин. Если такой возможности нет, то пересев альгологически чистых культур можно проводить непосредственно в комнате над пламенем горелки или спиртовки. Сначала над пламенем горелки обрабатывают горлышко колбы с культурой; после этого инокулят (объём – от 20 до 50 мл) переносят в стерильную колбу и добавляют питательную среду. Колбу закрывают стерильной ватно-марлевой пробкой, подписывают название вида водоросли, дату пересева и ставят на стеллаж с подсветкой или специальный ламинированный шкаф.

Пересев культур жгутиковых микроводорослей нужно проводить через 10–12 дней, диатомовых – через 5–7 дней. Микроводоросли нельзя длительное время выдерживать без пересева, т. к. макро- и микроэлементы, которые они получают из питательной среды, уже будут использованы за этот период и клетки начнут отмирать.

При этом патогенная микрофлора, в результате отмирания клеток водорослей, может активно развиваться, что приведет к гибели культуры. Признаком угнетения жизнеспособности культуры является изменение цвета – пожелтение, появление белёсого оттенка или помутнение.

Сохранение маточных культур в хорошем состоянии является важным этапом в процессе успешного наращивания стартовых культур.

*Стартовые культуры.* Для наращивания стартовых культур используют круглые плоскодонные колбы объёмом 2–5 л. Их размещают на специальных стеллажах (желательно со стеклянными полками), на задних стенках которых установлены люминесцентные лампы мощностью 36–80 Вт, обеспечивающие суммарную освещённость на поверхности колб до 5 кЛк (рис. 29). Водоросли необходимо культивировать на питательных средах Конвея и F/2 при температуре +18...+24 °С и постоянной аэрации воздухом.

Продолжительность наращивания стартовых культур зависит от видовой принадлежности микроводорослей. Диатомовые водоросли культивируют в течение 5–7 дней, а жгутиковые – от 7 до 14 дней, после чего следует их пересеять. Для этого 200–250 мл стартовой культуры переносят в стерильную 2-литровую колбу, добавляют питательную среду и наращивают биомассу при указанных выше условиях. Это позволяет поддерживать в питомнике линию стартовых кормов. Оставшуюся часть стартовой культуры используют для наращивания промежуточной культуры объёмом более 20 л.

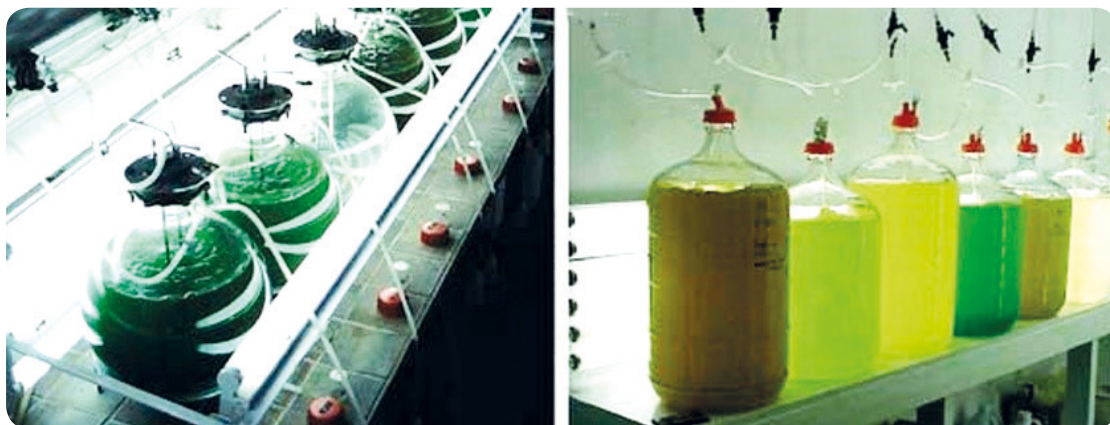


**Рисунок 29.** Наращивание стартовых культур в питомнике ФИЦ ИнБЮМ

*Промежуточные культуры.* В качестве культиваторов используют стеклянные колбы и баллоны или прозрачные пластиковые баллоны объёмом 20–25 л (рис. 30). Часть стартовой культуры необходимо перенести в эти баллоны, добавить питательную среду и круглосуточно аэрировать газовой смесью с углекислым газом.



Стерилизация посуды и морской воды при наращивании промежуточных культур осуществляется химическим способом. Температурный и световой режим такой же, как при культивировании стартовых кормов. После того как биомасса водоросли достигнет максимальных значений, она используется для массового культивирования.



**Рисунок 30.** Промежуточные культуры водорослей, наращиваемые в стеклянных баллонах [по Sorgebous, 1996]

*Массовое культивирование микроводорослей.* В зависимости от мощности питомника и потребности в корме при массовом культивировании микроводорослей используют разные типы культиваторов: полиэтиленовые одноразовые мешки (рукава) или цилиндрические баки объёмом 100–300 л.

В питомнике ФИЦ ИнБЮМ, рассчитанном на получение 500 тыс. экз. спа-та устриц, водоросли наращивают в одноразовых мешках, изготовленных из полиэтиленового рукава (ширина – 25 см, толщина стенок – 300 мкм).

Морскую воду для приготовления питательной среды необходимо простерилизовать термически ( $t = +75...+80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). После этого добавляют макро- и микроэлементы согласно прописи среды Конвея или среды F/2.

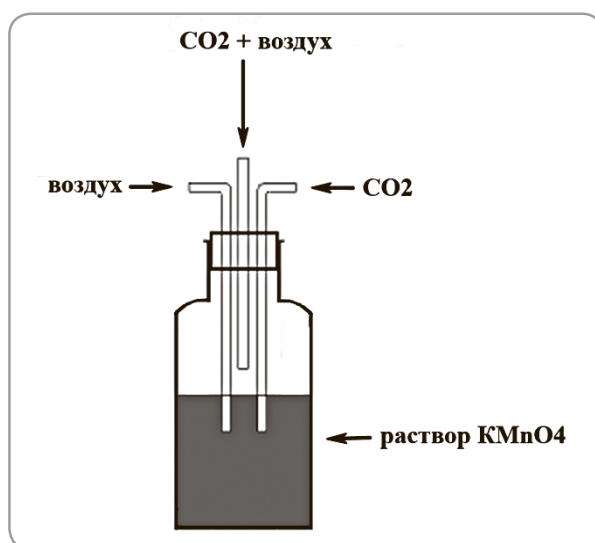
В культиваторы (мешки из полиэтиленового рукава), на 1/3 заполненные питательной средой, вносят 4–6 л стартовой культуры и добавляют оставшуюся питательную среду. Мешки подвешивают перед панелью из люминесцентных ламп, расположенных горизонтально. Максимальная освещённость поверхности культиваторов должна составлять 10 кЛк (рис. 31).

Культивирование водорослей осуществляется при температуре  $+22...+24\text{ }^{\circ}\text{C}$  и круглосуточном барботировании газовой смеси, содержащей 2 %  $\text{CO}_2$ . Углекислый газ из баллонов, предварительно смешивают с воздухом в соотношении 2:100.

Количество углекислого газа регулируется с помощью манометра, установленного на баллоне. Смесь воздуха и углекислого газа перед поступлением в культиватор проходит очистку через раствор марганцовокислого калия ( $\text{KMnO}_4$ ), приготовленный на дистиллированной воде ( $V = 10\text{ л}$ ), концентрации 0,2–0,3 % (рис. 32).



**Рисунок 31.** Массовое культивирование микроводорослей в одноразовых полиэтиленовых мешках в питомнике ФИЦ ИнБЮМ



**Рисунок 32.** Схема смешивания воздуха с углекислым газом и очистка газовой смеси раствором  $\text{KMnO}_4$

Барботаж культуры водорослей газовой смесью способствует значительному увеличению биомассы за короткий промежуток времени. Углекислый газ выполняет несколько функций:

- является источником углерода для процесса фотосинтеза в клетках водорослей;
- стабилизирует pH среды.

Реагируя с водой, углекислый газ образует угольную кислоту, которая ионизируется в бикарбонат; в результате pH культуральной среды стабилизируется до 8,2–8,5.

При таких оптимальных условиях культивирования биомасса водорослей увеличивается в 2–4 раза на модифицированной среде Конвея через 12–14 дней, а на среде F/2 – через 7–10 дней.

При мощности питомника, превышающей 500 тыс. экз. спата, для культивирования микроводорослей используются культиваторы объёмом 100–300 л, изготовленные из стекловолокна или стеклопластика. Культиваторы устанавливают вдоль стены перед вертикально расположенными люминесцентными лампами (рис. 33А); либо над каждым культиватором лампы подвешивают горизонтально (рис. 33В).



**Рисунок 33.** Культиваторы для микроводорослей, используемые в крупномасштабных питомниках [Sorgebous, 1996]

Количество используемых ламп зависит от высоты и диаметра культиваторов. Максимальная освещённость поверхности таких культиваторов 15–25 кЛк. Питательную среду готовят на морской воде, которую стерилизуют химическим способом. Для этого необходимо баки предварительно хорошо промыть горячей водой, после чего заполнить морской водой, профильтрованной через 1-мкм фильтр. Объём воды должен быть меньше 300 л, чтобы потом можно было добавить определённый объём промежуточной культуры.

Химическая стерилизация морской воды проводится следующим образом:

- приготовить 2,6%-ный раствор жавелевой воды (раствор гипохлорита натрия  $\text{NaClO}$ ).
- добавить к морской воде вместе с питательной средой  $40 \text{ мл} \cdot \text{л}^{-1}$  2,6%-ной жавелевой воды так, чтобы общий объём был меньше 300 л, и оставить на 2 ч;
- добавить затем в этот объём  $10,8 \text{ г}$  ( $36 \text{ мл} \cdot \text{л}^{-1}$ ) тиосульфата натрия (разбавленного в морской воде) и оставить на 1–2 ч, чтобы нейтрализовать ионы хлора;

- после окончания стерилизации морской воды внести 20–25 л промежуточной культуры водорослей.

Для химической стерилизации морской воды можно использовать обычный домашний отбеливатель, т. е. 5%-ный раствор гипохлорита натрия. На 1 л фильтрованной морской воды добавить 0,5 мл отбеливателя. Для нейтрализации ионов хлора в морской воде необходимо добавить раствор тиосульфата натрия (в избытке) – 50 мл·л<sup>-1</sup>.

Дальнейшее культивирование водорослей осуществляется при оптимальной температуре +22...+24 °С и круглосуточном барботаже газовой смеси, содержащей 2 % CO<sub>2</sub>.

### 3.2.3. Фазы роста микроводорослей

В процессе массового культивирования водорослей можно выделить три основные фазы роста: лаг-фазу, экспоненциальную и стационарную, в ходе которых изменяется численность клеток и их качественный (биохимический) состав (рис. 34).

Лаг-фаза – это период акклиматизации водорослей после перевода стартовой культуры в промежуточную или промежуточной – в массовую. Эта фаза длится не более 2–3 дней. Экспоненциальная фаза – период, когда после адаптации водорослей к условиям культивирования клетки начинают активно делиться за счёт достаточного количества питательных веществ. Их численность увеличивается в геометрической прогрессии.

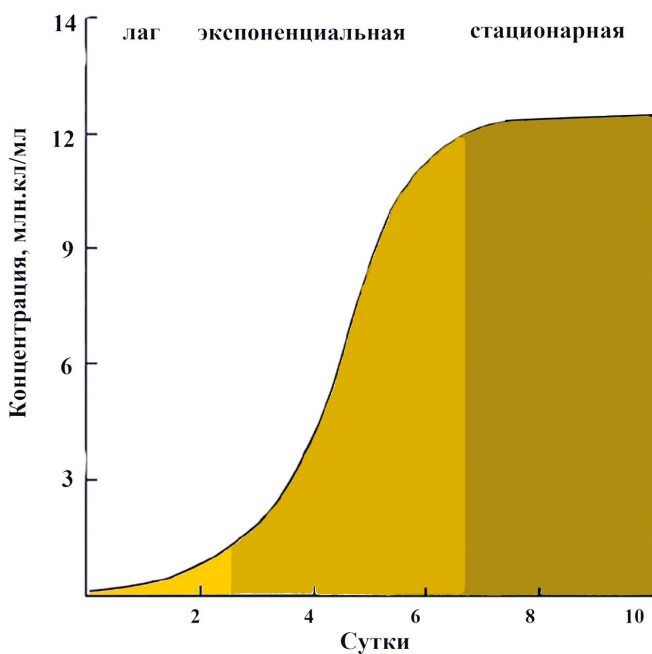


Рисунок 34. Фазы роста микроводорослей на примере *Isochrysis galbana*

В зависимости от вида водорослей и условий культивирования экспоненциальная фаза может длиться от 4 до 10 дней. В это время в клетках микроводорослей накапливается максимальное количество белка.

Стационарная фаза роста характеризуется снижением скорости деления клеток, за счёт недостаточного количества макро-, микроэлементов и света, проходящего через плотную культуру. Концентрация клеток водоросли достигает максимальных значений и в них накапливается максимальное количество липидов. Этот период у жгутиковых водорослей может длиться от 7 до 10 дней. У диатомовых водорослей стационарная фаза продолжается не более 2–4 дней, после чего клетки отмирают.

### 3.2.4. Режимы культивирования микроводорослей

При массовом культивировании водорослей в питомнике целесообразно использовать два режима – полунепрерывный и накопительный.

*Полунепрерывный режим.* При полунепрерывном режиме изымается часть биомассы, когда культура водоросли находится на экспоненциальной фазе, добавляется питательная среда и процесс культивирования продолжается. При таком режиме культивирования численность клеток водорослей небольшая, но содержание белка в них максимальное, поэтому их целесообразно использовать в качестве корма для личинок устриц на стадиях велигера и великонхи (табл. 8).

**Таблица 8.** Рост микроводорослей при полунепрерывном режиме культивирования на питательной среде Конвея

Вид водоросли	Концентрация клеток, $\times 10^6$ кл. · мл <sup>-1</sup>	Биомасса (сырая), г · л <sup>-1</sup>	Содержание белка, % (от сухого веса)
<i>I. galbana</i>	10,10	0,392	49,8
<i>M. lutheri</i>	18,70	0,174	33,0
<i>T. suecica</i>	2,29	1,162	30,4
<i>D. viridis</i>	2,13	1,130	37,1
<i>C. calcitrans</i>	0,64	0,204	40,4
<i>P. tricornutum</i>	22,73	1,822	40,7
<i>S. costatum</i>	2,85	0,749	44,4
<i>R. salina</i>	3,58	2,466	35,2

При полунепрерывном режиме культивировании управлять процессом роста культуры можно путём её разбавления, когда она находится в конце экспоненциальной фазы роста. При этом плотность культуры изменяется в зависимости от изымаемого объёма и частоты внесения питательной среды.

Чтобы микроводоросли длительное время находились на стадии экспоненциального роста необходимо регулярно отбирать  $\frac{1}{4}$  часть объёма культуры и добавлять такой же объём питательной среды. При полунепрерывном режиме культивирования диатомовых водорослей (скелетонема, хетцерос, феодактилюм) разбавление нужно проводить ежедневно; для изохризиса и монохризиса – через двое суток, а для тетраселмиса, родомонса и дуналиеллы – через трое суток. Например, если *S. costatum* наращивать в баке объёмом 300 л, то ежедневно необходимо отбирать 75 л ( $\frac{1}{4}$  часть объёма) культуры и добавлять такое же количество питательной среды.

Однако при полунепрерывном режиме, вследствие длительного периода культивирования водорослей в одном культиваторе, существует опасность их загрязнения микроорганизмами (бактериями, инфузориями).

**Накопительный режим.** Накопительный режим культивирования предусматривает накопление биомассы водорослей до тех пор, пока не будут израсходованы все биогены, вследствие чего – деление клеток микроводорослей замедляется. При накопительном режиме в культиваторы засевают стартовую (или промежуточную) культуру, добавляют питательную среду и при оптимальных условиях, указанных выше, наращивают биомассу водорослей до максимальных значений. Культура выходит на стационарную фазу роста в результате снижения концентрации биогенов в культуральной среде. На этой фазе роста в водоросли содержат максимальное количество липидов.

Поскольку накопление биомассы водорослей зависит от содержания биогенов в питательной среде, то при аналогичных условиях культивирования, но на разных питательных средах можно получать разные значения биомассы (табл. 9).

**Таблица 9.** Рост микроводорослей в накопительном режиме культивирования на разных питательных средах

Вид водоросли	Максимальная концентрация клеток водорослей, $\times 10^6$ кл. · мл <sup>-1</sup>		Содержание липидов, % (от сухого веса)
	Среда Конвея	Среда F/2	
<i>I. galbana</i>	16,45	24,05	25,60
<i>M. lutheri</i>	18,75	30,25	28,57
<i>T. suecica</i>	3,90	6,41	20,90
<i>D. viridis</i>	4,25	6,85	18,00
<i>C. calcitrans</i>	1,06	11,22	27,00
<i>P. tricornutum</i>	31,85	40,37	20,00
<i>S. costatum</i>	4,11	6,82	27,00
<i>R. salina</i>	5,43	–	41,00

Биомасса водорослей, полученная при накопительном режиме культивирования, полностью изымается из культиваторов и используется на корм личинкам устриц поздних стадий развития и спата.

Накопительный режим культивирования микроводорослей в питомнике считается самым надёжным для получения максимальных биомасс кормовых водорослей при условии строгого соблюдения стерильности.

### **3.2.4.1. Причины гибели микроводорослей при культивировании**

В процессе длительного культивирования водорослей в питомнике бывают случаи гибели культур. Это может случиться при культивировании любых видов водорослей – жгутиковых и безжгутиковых. Очень важно своевременно обнаружить и устранить причину.

Если водоросли осели на дно культиватора, необходимо:

- Выяснить, достаточно ли воздуха поступает в культиваторы, и при необходимости увеличить скорость воздушного потока.

- Проверить, были ли изменения температурного режима в помещении в последние 24 часа. Повышение температуры свыше +26 °С губительно сказывается на росте не только всех видов диатомовых водорослей, но и большинства жгутиковых. При такой температуре в культиваторах активно развивается патогенная микрофлора и культура погибает. При температуре ниже +14 °С рост водорослей тормозится, поэтому необходимо соблюдать оптимальный температурный режим.

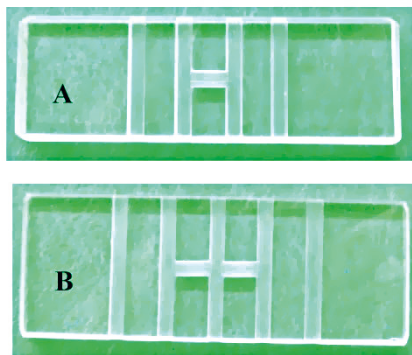
- Проверить pH культуральной среды с помощью pH-метра, чтобы выяснить является ли он слишком высоким (> 8,5) или слишком низким (< 7,5). Убедиться, есть ли в баллоне углекислый газ, и отрегулировать подачу CO<sub>2</sub>, чтобы установить оптимальное значение pH среды.

- Проверить в рабочем журнале запись, когда последний раз вносили питательную среду, поскольку рост водорослей замедляется при недостаточном количестве питательных веществ в культуральной среде, особенно при полунепрерывном режиме культивирования.

- Проверить жизнеспособность водорослей. При появлении пены в верхнем слое культуральной среды процесс дальнейшего культивирования необходимо прекратить, т. к. клетки водорослей начали отмирать, в результате загрязнения микроорганизмами. Если отмирание водорослей произошло через 3–4 дня после начала процесса массового культивирования, то необходимо проверить стартовые или промежуточные культуры на наличие микроорганизмов. В случае обнаружения загрязнения эти культуры следует ликвидировать.

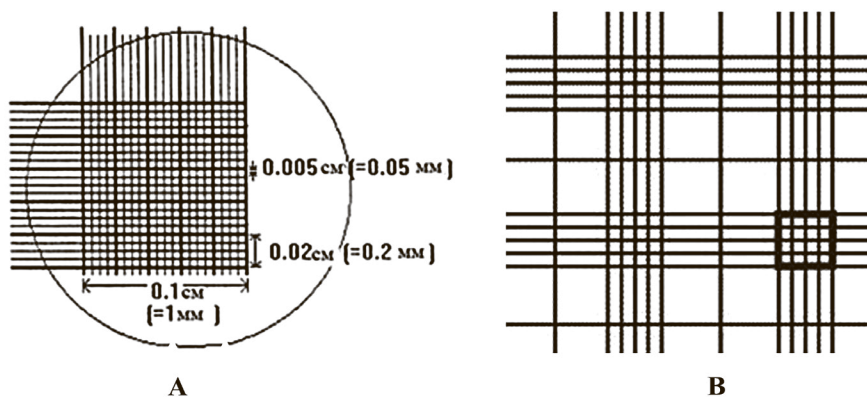
### 3.2.5. Определение концентрации клеток микроводорослей

При составлении рационов для личинок устриц необходимо знать концентрацию (или численность) клеток культуры каждого вида водорослей. Её определяют прямым подсчётом в камере Горяева при помощи микроскопа. Камеры Горяева выпускаются в двух модификациях – двухсеточные (двухкамерные, рис. 35А) и четырёхсеточные (четырёхкамерные, рис. 35В).



**Рисунок 35.** Камера Горяева, внешний вид: А – 2-камерная; В – 4-камерная

В камерах две или четыре площадки соответственно с нанесённой специальным образом микроскопической сеткой, которая разделена на большие и маленькие квадраты. Для подсчёта клеток водорослей вначале нужно подготовить камеру. Её накрывают специальным покровным стеклом и тщательно притирают до появления колец Ньютона, которые указывают, что покровное стекло притёрто к сторонам камеры. После этого через бороздки камеры с помощью микропипетки вносят суспензию микроводорослей. Если клетки водорослей подвижные, то перед подсчётом их необходимо обездвижить спиртом или слабым раствором уксусной кислоты. Затем подсчитывают число клеток в 25 квадратах; полученную сумму умножают на  $10^4$  – и получают число клеток в 1 мл суспензии.



**Рисунок 36.** Камера Горяева с нанесённой сеткой: А – 25 больших квадратов; В – один большой квадрат



При подсчёте учитывают все клетки, размещённые внутри квадрата и на пограничных линиях, если большая часть клетки лежит внутри квадрата. Если в одном большом квадрате число клеток превышает 100, то суспензию необходимо развести в 5–10 раз для более точного подсчёта, а в расчётах сделать поправку на разведение.

Например, если в 25 квадратах было 350 клеток, а суспензия водорослей была разведена в 10 раз, тогда концентрация клеток в 1 мл суспензии составит:  $350 \times 10^4 \times 10 = 35 \times 10^6$  кл.·мл<sup>-1</sup>.

Для точного определения плотности культуры необходимо провести подсчёт клеток в трёх повторностях и найти среднее значение. Именно поэтому для определения плотности культуры целесообразнее использовать 4-секционную камеру Горяева.

### **3.2.6. Концентрированные корма**

Культивирование живых кормов при выращивании двустворчатых моллюсков в настоящее время хорошо отработанный технологический процесс. Однако основным недостатком массового культивирования микроводорослей – высокие эксплуатационные затраты, которые иногда могут составлять половину финансовых расходов особенно для небольших питомников. Например, затраты на 1 кг сухого веса водорослей составляют \$300–500. Поэтому, чтобы снизить себестоимость производства микроводорослей, начали использовать альтернативные корма – концентраты из водорослей. Стоимость концентрированных водорослей обычно гораздо меньше, чем живых водорослей, выращиваемых в питомнике. Так, предприятие Reed's Instant Algae products, которое занимается производством концентрированных кормов, продаёт 1 л пасты за \$12,00 [Ludi Parwadani Aji, 2011].

Культивирование микроводорослей для получения концентратов необходимо начинать значительно раньше, чем начнутся работы по выращиванию личинок устриц в питомнике. Наиболее распространённые методы получения концентрированных водорослей – центрифугирование и флокуляция. Центрифугирование является эффективным методом для микроводорослей с плотной клеточной оболочкой – тетраселмис, дуналиелла, скелетонема, хетоцерос. Водоросли необходимо центрифугировать при 3 тыс. об.·мин.<sup>-1</sup> от 3 до 10 мин., поскольку клетки микроводорослей, имеющие небольшой объём, при центрифугировании оседают медленнее, чем те, у которых объём больше. Именно поэтому следует подбирать продолжительность центрифугирования для каждого вида водорослей.

Недостатком этого метода является то, что процесс центрифугирования больших объёмов культур занимает много времени и требует дорогостоящего оборудования.

Флокуляция – это процедура осаждения взвешенных твёрдых частиц в растворе с помощью химической реакции, которая может быть успешно применена к суспензии микроводорослей. В суспензию микроводорослей добавляют специальные вещества (поликремниевую кислоту или полиа-

криламид), которые адсорбируют макромолекулы водорослей. В результате образуются хлопья, при отстаивании которых получается концентрированная паста.

Преимущества процесса флокуляции заключаются в простоте и низкой стоимости получения концентратов. А основным недостатком является то, что остаточный объем жидкости после концентрации – очень маленький, что значительно сокращает срок хранения пасты.

Полученные такими способами концентраты водорослей необходимо герметично упаковать в баночки или полиэтиленовые пакеты. На каждой упаковке должен быть указан вид водоросли и дата приготовления пасты (рис. 37).

Для сохранения качественного состава концентратов водорослей используются несколько методов: добавление консервантов, заморозка и охлаждение. Концентраты микроводорослей могут храниться от нескольких дней до нескольких месяцев. В зависимости от вида водоросли максимальное время, в течение которого паста может храниться и при этом не потерять свою пищевую ценность, эквивалентную живым водорослям, составляет от 1 до 8 недель.



**Рисунок 37.** Концентрированные пасты из микроводорослей

Например, химический состав концентрированных клеток *C. calcitrans* не изменяется в течение первых 3 недель хранения, а потом содержание органических веществ значительно уменьшается. Температура и условия хранения концентратов водорослей являются важными факторами, которые влияют на продолжительность их жизнеспособности. У большинства видов водорослей 85 % клеток сохраняют свою жизнеспособность при температуре +4 °С в течение двух месяцев.

Так, концентраты микроводорослей *C. calcitrans* и *S. costatum* остаются жизнеспособными в течение 3–4 недель при температуре +4 °С и хранении в темноте.

Рост спата устриц, в рацион которого входили эти водоросли, не отличался от роста спата, которого кормили живыми водорослями. Также не были обнаружены значительные различия в выживаемости и росте личинок *C. gigas*, если их в течение 14 дней кормили концентратами (срок хранения – 7–14 дней) и живыми водорослями *M. lutheri* + *I. galbana* [Ludi Parwadani Aji, 2011].

Следовательно, если концентраты водорослей, которые хранятся до 2 недель, использовать в качестве корма, то рост и выживаемость личинок устриц будут аналогичны таковым при кормлении живыми микроводорослями.

Перед использованием концентраты водорослей необходимо развести в небольшом объеме морской воды, чтобы получить однородную суспензию из целых неповреждённых клеток водорослей, и после этого внести в выростные ёмкости.

Видовой состав производимых концентратов водорослей значительно шире видового состава живых, культивируемых микроводорослей в питомниках, поэтому, приобретая концентраты, специалист, обслуживающий питомник, может значительно разнообразить состав корма для спата.

Однако следует отметить, что концентрированные корма не могут заменить микроводоросли, выращенные в питомнике, особенно для личинок на ранних стадиях развития, т. к. их качественный состав (содержание белка и высоконенасыщенных жирных кислот) значительно ниже. Лучшее решение при подборе качественного состава корма – это поиск оптимального соотношения живых кормов и их концентратов.

## Глава 4.

# УЛУЧШЕНИЕ ТОВАРНОГО КАЧЕСТВА ГИГАНТСКОЙ УСТРИЦЫ *CRASSOSTREA GIGAS* ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Известно, что в весенний период в связи с созреванием гамет содержание гликогена в мягких тканях тихоокеанских устриц уменьшается. Перед нерестом гонады устриц могут составлять до 40 % веса мягких тканей. После нереста устрицы теряют вкусовые качества, они становятся истощёнными и водянистыми. В таком состоянии они непригодны для маркетинга.

Многолетний опыт выращивания устриц показал, что существует смертность в результате так называемой летней болезни, которая, как полагают, вызвана физиологическим стрессом во время размножения [Helm et al., 2004]. С получением триплоидного спата в питомнике, не способного к размножению, решаются обе задачи: сохранение вкусовых качеств устриц товарного размера в течение года и повышение их выживаемости [Stiles, Choromanski, 2002].

Сегодня спрос на триплоидный спат, выращенный в питомниках, значительно превосходит поставки, несмотря на более высокую цену по сравнению с ценой диплоидного спата. Объём выращивания таких устриц всё время увеличивается. Так, например, в 2005 г. питомники Франции произвели 800 млн экз. спата, 80 % которого составили триплоиды (Buestel et al., 2009).

### 4.1. Полиплоидия

Искусственно вызванная триплоидия – это один из генетических методов, направленных на повышение продукционных показателей устриц. Впервые технологии производства триплоидных устриц были разработаны на тихоокеанском побережье Северной Америки в 80-е гг. XX столетия [Stanley et al., 1981; Downing, Allen, 1984; Chaiton, Allen, 1985].

Триплоидов получают методом блокировки анафазы I мейотического деления после оплодотворения яйцеклетки гаплоидной спермой (1n). При этом геном яйца остаётся в диплоидном состоянии (2n).

#### **Известно несколько способов получения триплоидных устриц:**

- ингибирование (торможение) первого мейотического деления химическим (раствором цитохалазина Б) [Stanley, 1981] или физическими способами (высоким давлением; температурой воды, выше или ниже оптимального значения для оплодотворения) [Quillet, Panelay, 1986; Beaumont, Faibrother, 1991; Guo et al., 1996];

- скрещивание диплоидных устриц с тетраплоидными.

В ядре соматических клеток триплоидных моллюсков имеются три набора хромосом ( $3n = 30$  хромосом). По причине несбалансированности набора хромосом формирование половых клеток не происходит, и потребляемая энергия идёт на соматический рост.

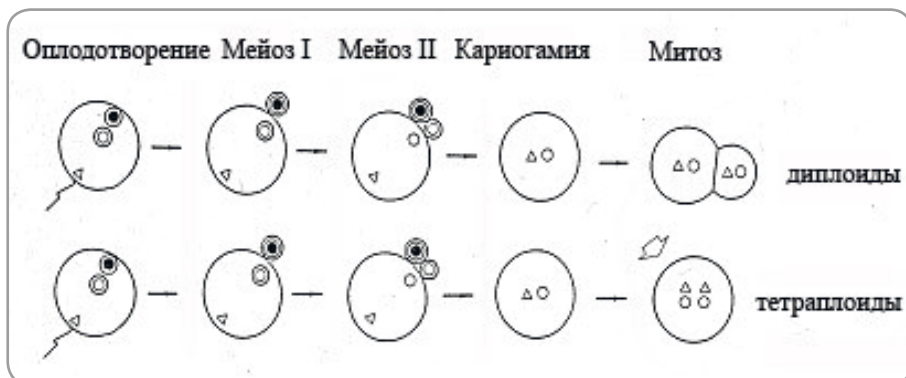
Линейный и весовой рост триплоидных устриц превышает рост диплоидных ( $2n = 20$  хромосом) на 40–50 %. Поскольку триплоидные устрицы не дают потомства, их необходимо каждый раз производить в питомнике.

Первоначально большинство триплоидных устриц было индуцировано обработкой оплодотворённых яйцеклеток цитохалазином Б после появления первого полярного тельца [Stanley, 1981]. Со временем техника была доведена до совершенства, и показатель триплоидов составил около 90 %. Между тем метод не позволяет получить 100 % триплоидов из-за неодновременности оплодотворения яйцеклеток и асинхронности прохождения процесса мейоза. Проблема также состоит в том, что цитохалазин Б является канцерогенным веществом; хотя он применяется только для обработки оплодотворённых яйцеклеток, существует вероятность передачи токсического эффекта эмбрионам. Поэтому химический метод производства триплоидных устриц обычно не используется в промышленных питомниках.

В настоящее время в некоторых питомниках применяют метод теплового шока [Quillet, Panelay, 1986]. Оплодотворение яйцеклеток происходит при  $+25$  °C; затем, через 20 мин. после оплодотворения, их переносят на 2 мин. в воду температуры  $+32$  °C и возвращают в воду с температурой  $+25$  °C. Температурный шок применяется после выделения первого направительного тельца. После усовершенствования этого метода выход триплоидов составил в среднем около 90 %. В дальнейшем возникла необходимость разработки метода, который бы позволил получать 100 % триплоидов. Исследования в профильных институтах Франции и США привели к разработке метода получения тетраплоидных ( $4n$ ) самцов устрицы. При скрещивании с диплоидными самками всегда получают триплоидных потомков. Метод эффективен и широко применяется в промышленных устричных питомниках.

Тетраплоидных устриц можно получить при блокировании первого митотического деления оплодотворённых яйцеклеток одним из выше указанных способов (рис. 38).

Линейный рост тетраплоидных устриц может быть несколько ниже, чем диплоидных, но они могут и не отличаться по темпу роста. По форме раковины тетраплоидные устрицы не отличаются от диплоидных. Триплоидные устрицы не классифицируются как генетически модифицированные организмы (ГМО). Их выращивают до товарного размера не только на тихоокеанском побережье США, атлантическом побережье Европы и Средиземного моря, но и на многих устричных фермах Чёрного моря у крымского побережья России. У триплоидных устриц левая створка более выпуклая, чем у диплоидных, и по форме напоминает лодочку. Между тем точное определение плоидности возможно только цитокариологическими методами. Для сохранения производителей живыми целесообразно оценивать плоидность по количеству хромосом в яйцеклетках.



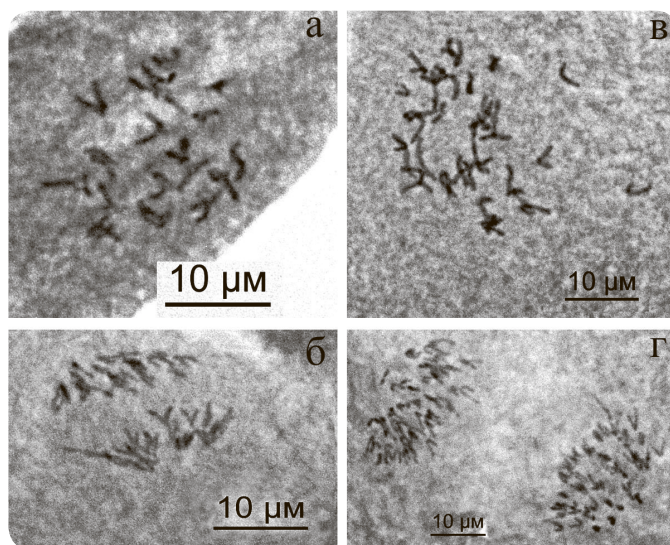
**Рисунок 38.** Схема получения тетраплоидов

#### 4.1.1. Получение полиплоидов в питомнике ФИЦ ИнБЮМ

*Получение тетраплоидов воздействием на оплодотворённые яйцеклетки аномальной температурой.*

Оплодотворенные яйцеклетки после выделения второго направительного тельца переносили в морскую воду с температурой +4 °С (или +35 °С) на 5 мин. Затем возвращали в воду +25 °С (рис. 39). Доля тетраплоидов составила 46–60 %. Выживаемость полиплоидных личинок на стадии велигера, полученных при воздействии водой низкой температуры, была выше.

*Получение тетраплоидов под воздействием высокого давления.* В прибор, создающий давление 8 атм, помещали открытую пластмассовую пробирку с оплодотворёнными яйцеклетками после выделения второго направительного тельца. Плотность посадки яйцеклеток – 50 тыс. яиц·л<sup>-1</sup>, продолжительность воздействия – 15 мин. Выход полиплоидов – до 60 %.



**Рисунок 39.** Диплоиды ( $2n = 20$  хромосом: а – метафаза митоза; б – анафаза митоза) и тетраплоиды ( $4n = 40$  хромосом: в – метафаза митоза; г – анафаза митоза) гигантской устрицы, полученные в питомнике ФИЦ ИнБЮМ

Получение триплоидов обработкой оплодотворённых яйцеклеток раствором цитохалазина Б (СВ) (рис. 40 и 41).

Через 5–7 мин. после оплодотворения при температуре воды +20 °С яйцеклетки переносили в 1 М раствор цитохалазина Б ( $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ). Объём ёмкости – 500 мл; плотность посадки яйцеклеток –  $5 \cdot 10^6$  яиц  $\cdot \text{л}^{-1}$ . Продолжительность воздействия – 15 мин. Затем яйцеклетки промывали в течение 5 мин. в профильтрованной морской воде и переносили в ёмкость с аэрированной морской водой. Эмбриональное развитие проходило при плотности посадки 50 тыс. эмбрионов на литр. При таком способе выход полиплоидов составил от 38 до 68 %.

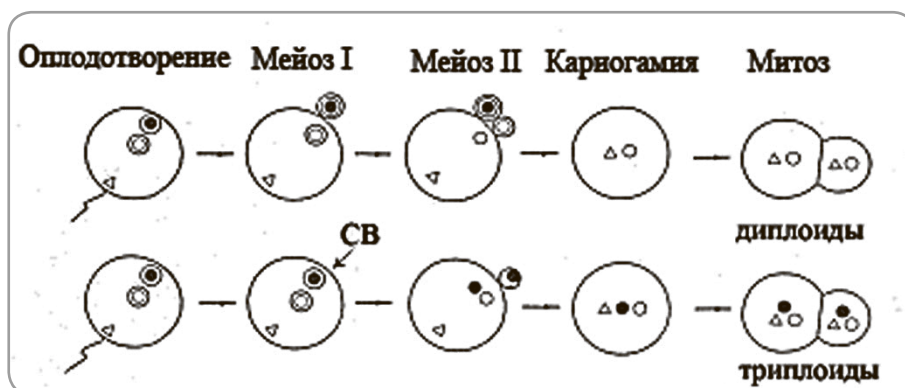


Рисунок 40. Схема получения триплоидов

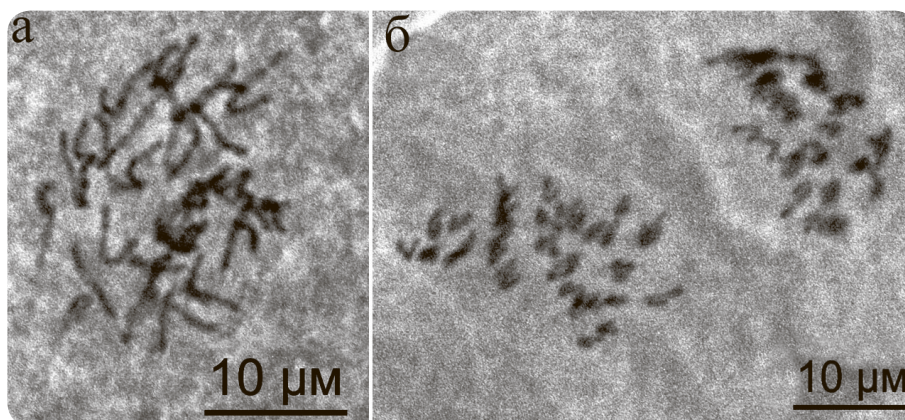


Рисунок 41. Триплоиды гигантской устрицы ( $3n = 30$  хромосом; а – прометафаза митоза; б – анафаза митоза)

#### 4.2. Эколого-географическое направление селекции гигантской устрицы

В настоящее время масштабы работы с полиплоидными устрицами поразительны, но, на наш взгляд, преимущество будет в других областях генетики, таких как количественная генетика, включающая селекцию.

Как указано в отчёте Всемирного банка, разведение моллюсков с применением селекции может увеличить темп роста за одно поколение более чем на 10 % (World Bank, 2006). Такое улучшение позволит сократить их себестоимость и увеличить конкурентную способность питомников.

С развитием устричных питомников стало возможным проведение селекции с целью выделения штаммов или рас, лучше приспособленных к определённым условиям выращивания. Стимулом для развития генетических программ устриц стало также выведение линий с высоким темпом роста, выживаемостью и устойчивостью к болезням. Это даст возможность по примеру сельского хозяйства увеличить производство белка только от генетических улучшений моллюсков.

Выживаемость личинок связана с условиями культивирования, включая состав корма и концентрацию микроводорослей, температуру и солёность воды. При оптимальных условиях выращивания личинок и спата их рост, продолжительность развития и выживаемость в первую очередь зависят от наследственных факторов.

Географическая изоляция популяций гигантской устрицы приводит к биологической и эволюционной дифференциации. В разных эколого-географических условиях создаются экотипы, отличающиеся как формой раковины, так и хозяйственно-ценными признаками. Признаки, которыми должны обладать культивируемые моллюски, «рассеяны» в природных популяциях и являются источником генетического разнообразия. Сущность эколого-географического направления селекции гигантской устрицы заключается в объединении разобщённых признаков в потомстве.

В устричном питомнике ФИЦ ИнБЮМ сформировано маточное стадо устриц, отобранных из природной популяции Японского моря (тихоокеанская когорта) и выращенных в питомнике побережья Испании (атлантическая когорта). Были проведены два типа скрещиваний по схеме:

♀♀ тихоокеанская когорта × ♂♂ атлантическая когорта;

♀♀ атлантическая когорта × ♂♂ тихоокеанская когорта.

Личинки выращивали при оптимальной температуре воды (+22,3...+24,3 °С) и оптимальной плотности посадки. В качестве субстратов для их оседания использовали специально подготовленные раковины мидий и пластмассовые диски. Спат подращивали в питомнике в течение 26 сут. в двух ёмкостях объёмом 450 л с ежедневной сменой воды, постоянной аэрацией и подачей корма три раза в сутки.

Сравнение метрических характеристик производителей, отобранных для скрещивания, показало, что тихоокеанская когорта устриц имеет более плоскую раковину, чем атлантическая. Об этом можно судить по индексу формы:  $IF = 1,65$  и  $IF = 2,23$  соответственно у тихоокеанских и атлантических (рис. 42).



Индекс формы раковины производителей рассчитывали по формуле:

$$IF = \frac{(H + t)}{L},$$

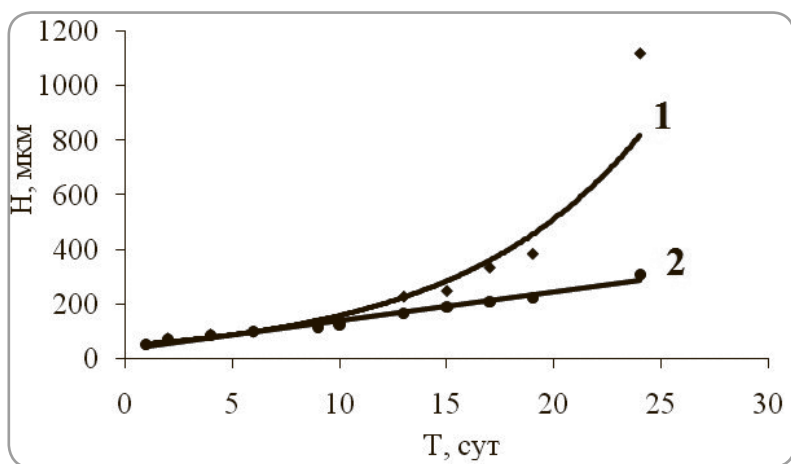
где: H – высота, мм; t – толщина, мм;

L – длина, мм раковины устриц [Холодов и др., 2017].



**Рисунок 42.** Маточное стадо гигантской устрицы *Crassostrea gigas*: первый ряд – тихоокеанская когорта; второй ряд – атлантическая

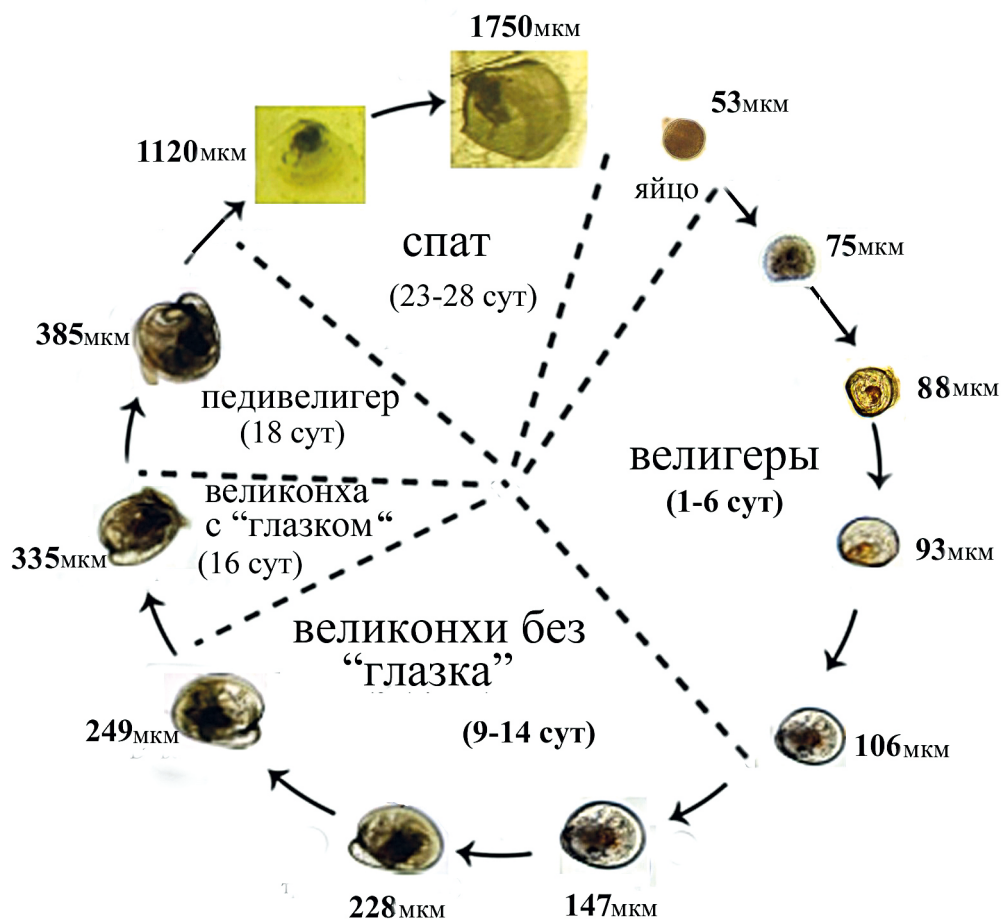
Среднесуточный прирост гибридных личинок на стадии велигера составил  $8,2 \text{ мкм} \cdot \text{сут}^{-1}$ , на стадиях великонхи и педивелигера –  $20,4$  и  $25,2 \text{ мкм} \cdot \text{сут}^{-1}$  соответственно, что выше максимальных значений прироста, которые установлены для личинок, полученных при скрещивании производителей черноморской когорты (рис. 43).



**Рисунок 43.** Рост личинок гигантской устрицы *Crassostrea gigas*, полученных при скрещивании тихоокеанской и атлантической когорты (1) и особей черноморской когорты (2)

На протяжении всего периода выращивания выживаемость гибридных личинок была на уровне максимальных величин, отмеченных для гетерозисных потомков гигантской устрицы, и составила около 70 %.

Оседание гибридных личинок на субстрат произошло на 19-е сут. (рис. 44; табл. 10).



**Рисунок 44.** Рост и развитие гигантской устрицы *Crassostrea gigas* при скрещивании тихоокеанской и атлантической когорты.

Личинки от скрещивания черноморской когорты, выращивание которых проходило при сходных условиях, осели только на 26-е сут.

**Таблица 10.** Рост, развитие и питание гибридных личинок и спата гигантской устрицы *Crassostrea gigas*

Возраст, сут.	Стадия развития	Средний размер личинок и спата, мкм	Вид водоросли	Концентр. водоросли, тыс. кл.·мл <sup>-1</sup>	Плотность посадки личинок, тыс. лич.·л <sup>-1</sup>
0	яйцекл.	53,4	–	–	20
1	D-велигер	74,9	<i>I. galbana</i>	50	20
3	велигер	87,5	<i>I. galbana</i> , <i>M. lutheri</i> , <i>C. vulgaris</i>	50	10
5	велигер	93,0	<i>I. galbana</i> , <i>M. lutheri</i> , <i>C. vulgaris</i>	100	10
6	велигер	106,2	<i>I. galbana</i> , <i>M. lutheri</i> , <i>C. vulgaris</i>	100	10
9	великонха «б/гл.»	147,0	<i>I. galbana</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>C. calcitrans</i>	150	5
12	– // –	228,2	<i>I. galbana</i> , <i>T. suecica</i> , <i>C. calcitrans</i> , <i>P. tricornutum</i> , <i>C. vulgaris</i>	200	5
14	– // –	249,2	– // –	200	5
16	великонха «с гл.»	334,6	– // –	200	5
18	педи-велигер	385,0	<i>I. galbana</i> , <i>T. suecica</i> , <i>C. calcitrans</i> , <i>P. tricornutum</i> , <i>D. viridis</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>S. costatum</i> , <i>R. salina</i>	250–300	5
23	спат	1120,0	– // –	350	2

Среднесуточный прирост спата при подращивании в питомнике составил  $180 \text{ мкм} \cdot \text{сут}^{-1}$ . В середине августа коллекторы со спатом гигантской устрицы размерами около 5 мм были выставлены на доращивание на устричную ферму (рис. 45). Через четыре месяца средняя высота спата составила 46 мм, максимальная – 76,3 мм (рис. 46).



**Рисунок 45.** Спат гигантской устрицы перед выставлением в море на доращивание



**Рисунок 46.** Спат гигантской устрицы после подращивания в море в течение 4 месяцев

Таким образом, гибридную силу личинок и спата гигантской устрицы можно объяснить тем, что у потомков, полученных в результате эколого-географического скрещивания, норма реакции на изменяющиеся условия среды расширяется до пределов исходных популяций.

## Глава 5. УСТРИЧНЫЙ ПИТОМНИК

Устричный питомник предназначен для получения жизнестойкой устричной молоди (спата), которая в дальнейшем подращивается на морских фермах до товарного размера.

В зависимости от производительности устричные питомники можно подразделить на экспериментальные (десятки тысяч экз. спата в год), функционирующие в морских исследовательских и учебных учреждениях, и промышленные (миллионы и сотни миллионов экз. спата в год), поставляющие спат на устричные фермы.

Следует уточнить, что обычно экспериментальные и промышленные питомники производят спат также и других видов двустворчатых моллюсков: морских гребешков, мидий, тридакн, жемчужниц и т. д.

Питомник принято подразделять на две функционально и пространственно разделённые части: 1 – получение и выращивание личинок (англ. hatchery, фр. écloserie); 2 – подращивание спата до уровня жизнестойкой молоди (англ. nursery, фр. nurserie).

Основные этапы работ в любом устричном питомнике одинаковы и включают: формирование маточного стада; кондиционирование производителей и стимуляцию их нереста; получение и выращивание личинок; осажение личинок на субстрат и получение спата; подращивание спата до определённых размеров; отправку спата потребителям. Для этого требуются большие объёмы культур микроводорослей разных видов – корма для производителей, личинок и спата. Подробное описание всех технологических операций дано в главе 3 данного руководства.

Ниже приводятся рекомендации по организации типового устричного питомника, что необходимо для представления всей структуры питомника и объёма выполняемых биотехнических работ.

В качестве примера в главе 6 излагаются последовательность расчёта основных функциональных параметров питомника и определение технических характеристик оборудования для питомника производительностью 5 млн экз. спата за один нерест.

### 5.1. Подготовительные работы перед строительством питомника

Окончательное решение о строительстве питомника принимается после выполнения следующих предварительных работ:

1. Выяснить, что строительство питомника на морском побережье не противоречит действующему законодательству, а местные административные и контролирующие органы не запрещают реализацию данного проекта в выбранном месте.

2. Изучить возможности бесперебойного снабжения питомника качественной морской водой, в частности выяснить возможность получения

морской воды из скважины, которая обычно не загрязнена и не подвержена влиянию несанкционированных выбросов загрязнителей предприятиями и судами. В случае забора воды непосредственно из моря необходимо убедиться, что в пределах 1 км отсутствуют сбросы бытовых, промышленных и сельскохозяйственных вод, а морская вода в течение всего года не содержит загрязнителей в концентрациях, превышающих соответствующие ПДК.

3. На выбранной территории имеются все необходимые инфраструктуры (электричество, водопровод, газ, подъездные пути и т. д.).

4. Имеется возможность нанять либо подготовить квалифицированных специалистов для работы в питомнике.

5. Питомник должен располагаться близко к морю, что позволит уменьшить длину труб, а следовательно, снизить расходы на перекачку воды и на чистку труб от организмов-обрастателей. Площадку для питомника следует выбирать с возможностью его расширения в будущем. Питомник желательно располагать не у открытого берега, а на берегу бухты. Это позволит свести к минимуму длину заборной трубы и снизить высоту площадки над морем.

## **5.2. Выбор места для размещения питомника**

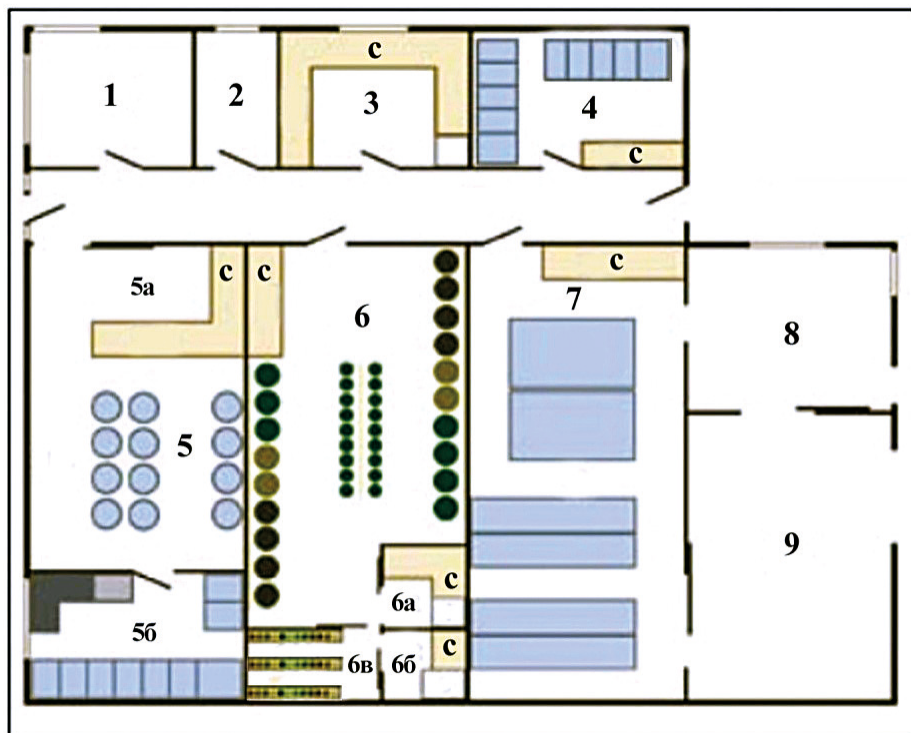
Одно из основных требований к месту для строительства питомника – наличие морской воды хорошего качества в необходимых объёмах. Для этого в течение года нужно провести анализ проб воды на предполагаемом участке, если такие исследования ранее не были выполнены. Следует обратить внимание на возможные сезонные изменения солёности морской воды (при норме 18 ‰) и насыщенности её кислородом (оптимальное значение – 100 %), так как развитие личинок и спата происходит только в диапазоне этих значений, которые должны поддерживаться в питомнике. Необходимо избегать мест с возможным влиянием хозяйственно-бытовых стоков и сточных вод, сбрасываемых промышленными предприятиями. Последствия таких стоков могут быть губительными для личинок устриц. В связи с этим рекомендуем провести биологический анализ с использованием эмбрионов мидий, выращенных до ранней личиночной стадии, что позволит определить качество морской воды для потенциального питомника. Хорошее качество воды подтверждается развитием личинок мидий без аномалий.

При подаче воды в питомник непосредственно из моря, водозабор необходимо установить ниже термоклина, что обеспечит в летнее время поступление воды постоянной температуры и солёности. Для предотвращения попадания с водой фрагментов водорослей и других гидробионтов необходимо оголовок водозабора закрыть сетью.

Если на суше имеется доступ к водоносным горизонтам морской воды, её желательно закачивать из скважины. В этом случае проблема качества морской воды может быть кардинально решена. Этот вариант предпочтительнее первого.

### 5.3. Общие сведения о структуре типового устричного питомника

Перед подробным рассмотрением каждого из участков устричного питомника рассмотрим кратко его структуру на примере типового питомника (рис. 47).



**Рисунок 47.** Схема питомника для получения спата гигантской устрицы (по материалам Helm et al., 2004). Обозначения: 1 – офис; 2 – туалет; 3 – сухая комната (микроскопы, весы, химреактивы); 4 – помещение для осаднения спата на субстрат; 5 – выращивание личинок: 5а – подсчёт и измерение личинок, 5б – помещение для кондиционирования производителей; 6 – зал для массового культивирования микроводорослей: 6а – отделение для маточных культур, 6б – отделение для автоклава и термостата, 6в – отделение для наращивания стартовых и промежуточных культур; 7 – помещение для подращивания спата; 8 – машинный зал – помещение для очистки морской воды, компрессорная и т. д.; 9 – складское помещение для хранения материалов и оборудования и упаковки спата для реализации; с – стеллажи

На данной схеме представлены все участки биотехнического процесса получения спата гигантской устрицы. Зал для культивирования микроводорослей (6) вместе с вспомогательными помещениями находится в центре питомника, что даёт возможность минимизировать длину трубопроводов, доставляющих корм потребителям (производителям, личинкам и спату).

Оборудование, создающее шум (воздуходувка) и выделяющее тепло (катоды люминесцентных ламп), а также насосы монтируются вне основных помещений в машинном зале (см. рис. 47).

Готовая культура микроводорослей подаётся потребителям по полиэтиленовым трубам с помощью перистальтических насосов.

План питомника должен предусматривать возможность дальнейшего расширения путём достройки новых помещений либо перестройки имеющихся без проведения капитального ремонта.

Все ёмкости для выращивания и резервуары для накопления морской воды должны быть пластиковыми или стеклопластиковыми для удобства их перемещения или замены.

Заранее нужно запланировать расположение стоков воды рядом с бетонными основаниями, на которых будут установлены ёмкости для выращивания личинок. Все поверхности питомника желательно покрыть устойчивым к плесени и легко моющимся материалом. Деревянные поверхности необходимо обработать эпоксидной смолой.

#### **5.4. Водоподготовка и распределение морской воды**

Выше говорилось о том, что морскую воду можно закачивать непосредственно из моря либо из скважины, пробуренной в прибрежной полосе. Во втором случае будет закачиваться вода, уже профильтрованная через пористый грунт, не содержащая взвесь и планктонные личинки организмов-областателей. Такая вода не нуждается в дальнейшей фильтрации с помощью песчаных фильтров. Кроме того, температура воды из скважины незначительно варьирует в течение года. Однако концентрация кислорода в воде может быть ниже нормы, поэтому необходимо предусмотреть её аэрацию.

Если в некоторые периоды (после шторма, в случаях аварийных выбросов загрязнителей или цветения воды и т. д.) вода в море оказывается непригодной для использования в питомнике, то вода из скважины доступна всегда. Именно поэтому при использовании воды из скважины нет необходимости в строительстве бассейна – накопителя морской воды. Забор воды из моря согласовывается с контролирующими органами, а на отбор воды из скважины разрешение не требуется.

Мощность насосов и диаметр труб зависят от производительности питомника и объёмов морской воды, необходимых для обеспечения всех этапов выращивания.

Важно убедиться, что трубы, а также все поверхности переходников труб и насосов, которые контактируют с морской водой, не токсичны. Токсичными являются пищевая нержавеющая сталь и пищевой алюминий. Крайне токсичными для личинок и микроводорослей являются медь и её сплавы – латунь, бронза. Подходящими материалами могут быть ПВХ (полихлорвинил или поливинилхлорид) и большинство пластмасс, чугун и определённые марки нержавеющей стали, которые в последнее время широко используются в зарубежных питомниках (см. <https://www.youtube.com/watch?v=3Ob9-V3Bc1c>). Возможно ограниченное применение стальных и чугунных изделий, но при условии, что все металлические поверхности будут покрыты слоем пластмассы.



Вода, закачиваемая из моря, проходящая по трубопроводам, несёт и личинок организмов-обрастателей (мидии, гидроиды, губки, асцидии и т. д.), которые прикрепляются к стенкам трубопроводов и затрудняют поток воды. Эти организмы периодически отмирают и, разлагаясь, выделяют токсические вещества, поэтому возникает необходимость в периодической чистке трубопроводов. Трубопроводы должны состоять из разъёмных недлинных участков, что облегчает их чистку. Необходимо продублировать систему подачи воды, что позволит проводить ремонт и чистку трубопроводов без остановки технологического процесса.

Морская вода, закачиваемая непосредственно из моря, либо сразу проходит через песчаные фильтры, которые отфильтровывают частицы размерами от 70 до 40 мкм (рис. 48) и затем поступает в бассейн-накопитель, либо поступает в бетонный бассейн-накопитель, из которого вода подаётся центробежным насосом на песчаный фильтр.

Серия из двух или более таких песчаных фильтров обеспечит механическую очистку воды. Песчаные фильтры должны регулярно промываться путём обратной фильтрации.

Во многих питомниках насосы для закачивания морской воды и песчаные фильтры (фильтрационная установка) расположены в отдельном помещении (в машинном зале), а окончательная фильтрация морской воды проводится в месте её использования.



**Рисунок 48.** Песчаный фильтр

После прохождения через песчаные фильтры вода подаётся в накопительные резервуары, закрытые крышками. Резервуары должны быть установлены выше рабочих ёмкостей для выращивания личинок и спата, что обеспечит функционирование питомника в случае перебоев с электроэнергией (рис. 49).

Из резервуара вода проходит через серию фильтров-картриджей с размерами пор 25, 10, 5 и 1 мкм на участок питомника для культивирования микроводорослей и 25, 10 и 2 мкм – на участок для выращивания личинок.



**Рисунок 49.** Резервуары для морской воды в экспериментальном питомнике ФИЦ ИнБЮМ

Следует отметить, что морская вода при фильтрации через механические фильтры (картриджи) остаётся в колбах в течение суток – период между сменами воды в баках с личинками (рис. 50). Для предотвращения развития инфузорий в фильтрах и засорения ими личинок устриц, выращиваемых в баках, фильтры необходимо ежедневно промывать пресной водой.



**Рисунок 50.** Механические фильтры для очистки морской воды и баки для выращивания личинок устриц (питомник ФИЦ ИнБЮМ)

Для этого следует закрыть кран № 1 и открыть краны № 2 и № 3 (см. рис. 50). После окончательного вытеснения морской воды пресной водой – закрыть краны № 2 и № 3. При очередной смене воды следует открыть краны № 1 и № 3 и заполнить систему морской водой. Вытесненную пресную воду необходимо слить.

В промышленных питомниках стерилизацию морской воды осуществляют проточными УФ-стерилизаторами. Стерилизация ультрафиолетом морской воды применяется после прохождения её через фильтр с порами < 1 мкм, т. к. ультрафиолетовое излучение легко поглощается частицами, взвешенными в воде.

Нагрев и охлаждение морской воды осуществляют с помощью теплообменников. Широкое применение для морской воды нашли титановые теплообменники, выпускаемые в Швеции. Поддерживать оптимальную температуру (+23 °С) морской воды возможно с использованием кондиционеров, отрегулировав температуру в помещении питомника.

### **5.5. Участок культивирования микроводорослей**

Водоросли являются основным кормом для производителей, личинок устриц на разных стадиях развития и спата. Они должны поступать в необходимом количестве и быть хорошего качества. Участок для наращивания кормов – важная составная часть любого питомника; следовательно, важно продумать его оптимальное расположение относительно других участков. Площади, отведённые для культивирования микроводорослей, определяются производительностью питомника и способами культивирования микроводорослей. Известно несколько способов культивирования водорослей:

- культивирование в питомнике при искусственном освещении;
- культивирование в теплицах при естественном освещении;
- комбинированный метод культивирования.

Площадь основного помещения для наращивания биомассы микроводорослей занимает значительную часть площади питомника и зависит от количества культивируемых видов и необходимого объёма водорослей.

Для культивирования микроводорослей при искусственном освещении должно быть несколько помещений (см. рис. 47):

- Комната для хранения коллекции микроводорослей. Это помещение должно быть изолировано, а температура воздуха не должна превышать +12 °С. Коллекция культур располагается на стеллажах, позади которых устанавливаются люминесцентные лампы – источник света. Там же устанавливают стол для приготовления питательных сред. Подача воздуха для культур, содержащихся в этом помещении, не требуется.

- Комната для наращивания стартовых и промежуточных культур. Это может быть отдельное помещение или часть основного помещения, размер которого зависит от числа видов и объёма выращиваемых водорослей.

Оптимальная температура в помещении – +16...+18 °С; необходима подача смеси воздуха и углекислого газа. В смежной комнате располагается термостат для стерилизации посуды и автоклав для стерилизации питательных сред.

- Комната для массового культивирования микроводорослей. Это самое просторное помещение на участке культивирования водорослей; его площадь зависит от типа культиваторов и необходимого объёма водорослей. Способ наращивания водорослей в высоких пластиковых цилиндрах, расположенных вдоль стенок с люминесцентными лампами или в полиэтиленовых мешках, поддерживаемых армированными стойками, даёт возможность рационально использовать площадь помещения (рис. 51).



**Рисунок 51.** Пластиковые цилиндры (IFREMER, La Tremblade, отчёт 1997) и полиэтиленовые мешки, поддерживаемые армированными стойками [SRAC, 2013], для массового наращивания микроводорослей

Оптимальная температура в помещении – +18...+24 °С. Обязательна подача смеси воздуха и углекислого газа.

Во многих питомниках значительная часть водорослей культивируется в теплицах, которые могут быть как в виде отдельных помещений, так и пристроенными к питомнику. В теплицах необходимо предусмотреть искусственное освещение, если солнечного света будет недостаточно. Для поддержания оптимальной температуры необходимо наличие кондиционера и регулярной подачи смеси воздуха и углекислого газа. На время отключения электроснабжения необходимо предусмотреть наличие генератора.

### **5.6. Участок содержания маточного стада и проведения нереста**

При круглогодичной работе питомника содержание и кондиционирование маточного стада гигантской устрицы должны происходить в отдельном помещении. Проточные аквариумы с производителями устанавливаются на стеллажах. Выход воды из каждого аквариума непосредственно связан с общей трубой, соединённой с канализационным выпуском.

К производителям поступает морская вода без предварительной фильтрации, которая содержит природный фитопланктон.

Должна быть предусмотрена и дополнительная подача корма с помощью перистальтических насосов или из пластиковых канистр, установленных рядом. Обычно производителей размещают на втором, решётчатом дне аквариума, сквозь которое проходят фекалии.

В период кондиционирования (подготовки производителей к нересту) аквариумы с производителями необходимо изолировать таким образом, чтобы можно было корректировать продолжительность фотопериода, поскольку различное соотношение светового и темного периодов влияет на созревание гонад устриц. Устриц содержат в аквариумах объёмом 120–150 л, причём общий вес устриц не должен превышать 5 кг. Проток воды регулируется из расчёта  $25 \text{ мл} \cdot \text{мин.}^{-1} \cdot \text{экз.}^{-1}$ . Температура воды в пределах  $+22 \dots +24 \text{ }^\circ\text{C}$  поддерживается с помощью теплообменника.

При сезонной работе питомника производителей содержат в море до созревания гонад. В этом случае кондиционирование производителей не проводится. Стимулировать нерест можно в нерестовых лотках, временно расположенных в помещении для выращивания личинок или подращивания спата. Для стимуляции нереста половозрелых особей требуются подогрев и охлаждение морской воды.

### **5.7. Участок выращивания личинок гигантской устрицы**

Самая большая часть площади питомника должна быть выделена для выращивания личинок (от оплодотворённых яйцеклеток до стадии педивелигера). Почти вся площадь этого участка занята баками, количество которых определяется производительностью питомника и применяемой технологией.

Новые баки необходимо тщательно отмачивать перед использованием, т. е. несколько раз заполнять пресной, а затем – морской водой. Для удобства работы с личинками баки устанавливаются на возвышении рядом со сливом воды. Конические баки со слегка округлённым дном и краном для слива, расположенным в нижней части, – наиболее удобные для смены воды. В таких баках при аэрации воды личинки равномерно распределяются по всему объёму и не скапливаются на дне, что обеспечивает их лучшую выживаемость.

Вода, предназначенная для выращивания личинок, фильтруется через серию фильтров; поры конечного фильтра должны быть не более 2 мкм. Профильтрованная вода насосом закачивается в закрытый пластиковый бак (запас на следующий день), установленный выше баков с личинками. В помещении для выращивания личинок должна быть холодная и горячая пресная вода для мытья баков.

Следует также предусмотреть относительно сухую зону для выполнения подсчёта и измерения личинок с помощью бинокля, например МБС-9. Там же необходимо установить полки для хранения сит разных размеров, используемых при обмене воды в баках с личинками, и для другого требуемого оборудования.

## 5.8. Участок подращивания спата

При появлении у личинок «глазка» и ноги (стадия педивелигера) личинки готовы к оседанию; их переносят в помещение для подращивания спата. Элементы биотехники при осадении личинок и выращивании спата определяются формой, размерами и качеством материала, из которого изготовлены субстраты для оседания. Осаждение личинок на субстраты можно проводить с использованием двух методов – применения коллекторов и крупки.

*Применение коллекторов.* Экспериментально установлено, что коллекторы, изготовленные из раковин мидий и дисков из пищевой пластмассы, являются удобными для оседания личинок и подращивания спата в море. Через две недели после оседания (высота раковин спата достигает 3 мм) коллекторы с осевшими устрицами можно выставлять в море на дорощивание, обтянув сетью (диаметр ячеей – около 7–10 мм) для предотвращения выедания рыбами спата. Этот метод особенно эффективен для питомников сравнительно небольшой производительности: в научных институтах, университетах, морских лицеях, а также при интродукции новых видов либо воспроизводстве исчезающих видов. Коллекторы собираются в виде гирлянд из дисков (например, диаметром 12 см) и раковин мидий и подвешиваются по всему объёму ёмкости (ванны) прямоугольной формы с округлыми углами объёмом не менее 2400 л (рис. 52). Для выращивания 5 млн экз. спата потребуется 6 таких ванн.



**Рисунок 52.** Ванны для оседания личинок и подращивания спата гигантской устрицы в экспериментальном питомнике ФИЦ ИнБЮМ

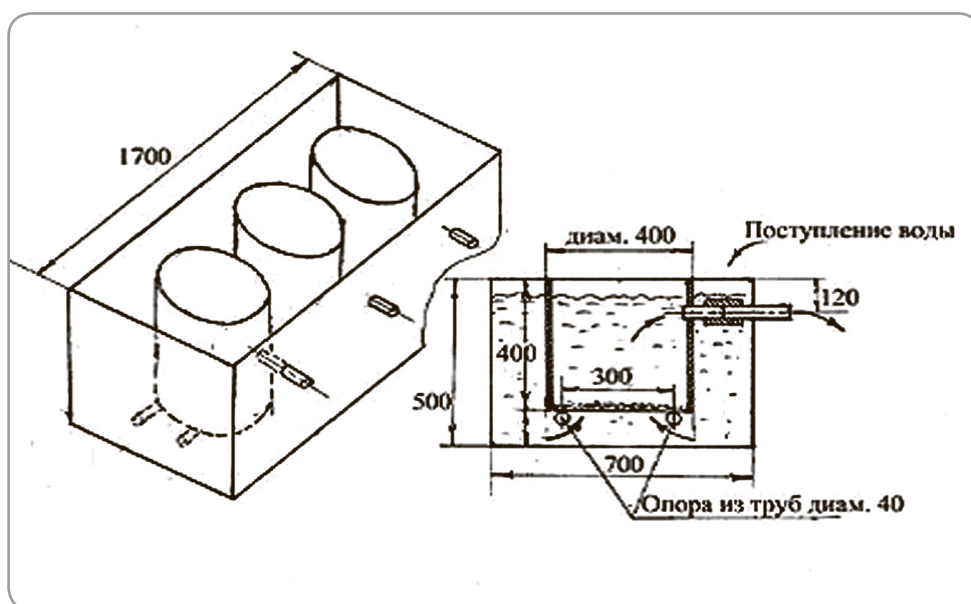
Новые пластмассовые диски и свежие раковины мидий предварительно вымачивают в море в течение двух месяцев, затем тщательно моют в пресной воде и дезинфицируют 10%-ным раствором соляной кислоты; после снова промывают в пресной воде и высушивают.

Стенки и дно ванн, в которых проводится осаждение, необходимо покрыть тонким слоем расплавленного парафина для предотвращения оседания на них личинок. Предварительно парафин нагревают в течение часа до температуры кипения. При этом испаряются летучие вещества. Процедуру следует проводить на открытом воздухе.

*Применение крупки.* Метод осаждения личинок устриц на крупку применяется в современных промышленных устричных питомниках. Крупка – это зерно размером 250–300 мкм, пригодное для прикрепления только одной личинки, в результате чего все устрицы отделены друг от друга. Её изготавливают в странах ЕС из раковин устриц, поэтому российским устрицеводам придётся либо импортировать крупку, либо наладить своё производство. Известно, что в СССР в 80-е гг. с помощью шаровых мельниц производили крупку из створок мидий для птицеводства. Возможно, что с использованием этой технологии удастся организовать производство крупки для устричных питомников.

При осаждении на крупку на 1 млн педивелигеров требуется 2 цилиндра диаметром 50 см, дно которых – из планктонного газа с размерами ячеек 200 мкм. Следовательно, для осаждения 10 млн педивелигеров понадобится 20 цилиндров, которые размещают в нескольких лотках суммарной длины 11 м.

Водоросли вносят в лоток с водой, и эрлифтом они переносятся в цилиндры с педивелигерами (см. рис. 25). После завершения оседания личинок подросший спат распределяется в выростные цилиндры, которые размещают в лотках (рис. 53).



**Рисунок 53.** Устройство для подращивания спата в питомнике

Оптимальная плотность размещения спата (размер – 400–600 мкм) в выростных цилиндрах – 200 г·м<sup>2</sup>. Цилиндры размещают в проточных лотках, которые обычно устанавливают снаружи питомника. Не фильтрованная вода (содержащая природный корм) насосом подаётся в лоток, проходит в цилиндры сквозь донное сито и слой спата и выходит наружу через трубки в верхней части цилиндра.

Если морская вода содержит недостаточное количество корма, его периодически вносят дополнительно, уменьшая при этом на определённое время проток воды через систему.

### **5.9. Аэрация морской воды**

Получение сжатого воздуха, его очистка и стерилизация осуществляются в отдельном помещении, в котором находится воздуходувка производительностью 1500 л·мин.<sup>-1</sup>, давлением 300 мбар (0,3 атм), система трубопроводов (ПВХ) Ø = 32 мм и установка с фильтрами для очистки воздуха (до 0,01 мкм) (см. рис. 47).

Воздух очищается, проходя через бактериальные фильтры, и по трубопроводу поступает на участки: водоподготовки, культивирования микроводорослей, кондиционирования производителей, выращивания личинок, осаждения личинок и подращивания спата. Необходимо предусмотреть периодическую замену бактериальных фильтров, используемых для очистки воздуха.



## Глава 6.

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ ПАРАМЕТРОВ УСТРИЧНОГО ПИТОМНИКА И ПОДБОР ОСНОВНОГО ОБОРУДОВАНИЯ ДЛЯ ЕГО ОСНАЩЕНИЯ

В предыдущих разделах были кратко изложены основы биологии гигантской устрицы и технологии получения спата, а также дано представление о структуре и функционировании питомника, производящего жизнестойкую молодь гигантской устрицы.

В данной главе на примере расчёта основных функциональных параметров устричного питомника производительностью 5 млн экз. спата за нерест изложена последовательность расчёта параметров питомника выбранной производительности. Эта последовательность расчёта (алгоритм) может быть использована для нахождения параметров питомника любой производительности.

### 6.1. Расчёт потребления воды

Весь технологический процесс выращивания личинок и спата устриц (включая культивирование микроводорослей) происходит в морской воде. Объёмы ежесуточно потребляемой воды определяют производительность и выбор основного технологического оборудования, в том числе габариты и количество необходимого оборудования, а, следовательно, и размеры всего питомника. Поэтому объём потребляемой морской воды является основным фактором, определяющим размеры и структуру питомника. Производительность питомника ( $P$ , экз. спата / нерест) – это количество спата, производимого за один нерест устриц-производителей. Известно, что количество искусственных нерестов в промышленных питомниках в течение года варьирует от нескольких единиц до нескольких десятков (например, 50).

Итак,  $P$  является исходной величиной для последующих расчётов. В данном случае рассматривается строительство питомника производительностью  $P = 5$  млн экз. спата за нерест. Исходя из этой величины, ниже выполнены расчёты объёмов фильтрованной и нефильтрованной морской воды, расходуемой на каждом этапе технологического процесса выращивания.

#### 6.1.1. Потребление фильтрованной воды при выращивании личинок

Анализ собственных и литературных данных показал, что при оседании выживаемость личинок устриц составляет 50 %; следовательно, при оптимальной плотности посадки  $2000 \text{ экз.} \cdot \text{л}^{-1}$  количество педивелигеров должно составлять 10 млн Личинок удобно выращивать в баках цилиндрической формы. Требуемый объём воды:

$$V = 10\,000\,000 \text{ экз.} / 2000 \text{ экз.} \cdot \text{л}^{-1} = 5000 \text{ л.}$$

Такой объём воды можно распределить в баках различного объёма (следовательно, потребуется разное количество баков). Обычно выбор делают на основе практических соображений относительно удобства выполнения данной операции. Иными словами, баков не должно быть слишком много или слишком мало. Выбираем баки, рабочий объём которых составляет 1000 л.

В этом случае для размещения всех педивелигеров понадобится 5 баков. Однако нужны ещё 5 баков, заполненных профильтрованной морской водой (для обеспечения режима смены воды). Таким образом, общее количество баков с рабочим объёмом 1000 л равняется 10.

Так как выживаемость личинок до стадии педивелигера составляет 50 %, к началу выращивания на стадии D-велигера общее количество личинок должно равняться 20 000 000 экз.

Плотность посадки личинок на этой стадии можно задавать в пределах 10 000–20 000 экз.·л<sup>-1</sup>. Требуемый объём воды для размещения личинок при плотности посадки 10 000 экз.·л<sup>-1</sup> в начале выращивания равен 2000 л:

$$20\,000\,000 \text{ экз.} / 10\,000 \text{ экз.} \cdot \text{л}^{-1} = 2000 \text{ л,}$$

а при плотности посадки 20 000 экз.·л<sup>-1</sup> – 1000 л:

$$20\,000\,000 \text{ экз.} / 20\,000 \text{ экз.} \cdot \text{л}^{-1} = 1000 \text{ л.}$$

Следовательно, при выращивании личинок на стадии велигера требуются 1–2 бака, а на стадии педивелигера – 5 баков.

Таким образом, суточный расход морской профильтрованной воды в процессе выращивания личинок изменяется от 2000 л (на стадии D-велигера) до 5000 л (на стадии педивелигера).

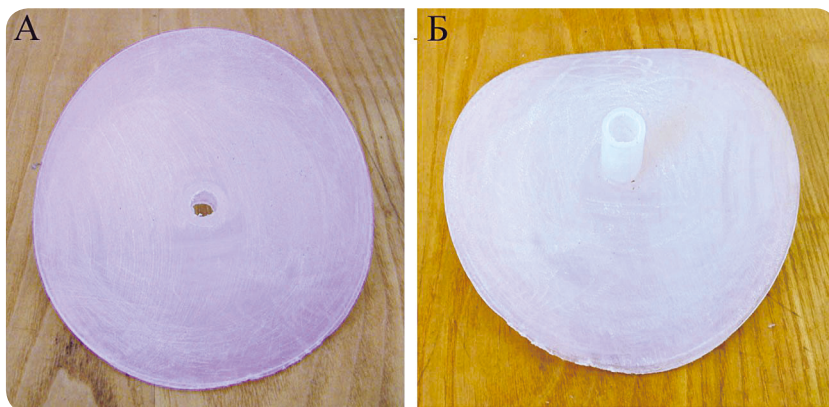
### **6.1.2. Потребление фильтрованной воды при осадении личинок на коллекторы (диски)**

В промышленных питомниках педивелигеров устриц осаждают на крупку, однако в связи с действующей системой санкций против РФ импорт крупки может оказаться невозможным. Мы рекомендуем в качестве субстрата для оседания личинок использовать диски, изготовленные из пищевой пластмассы (за исключением полиэтилена). Спат, осевший на коллекторы из дисков, не нуждается в длительном содержании в условиях питомника и после двухнедельного подращивания переносится на устричную ферму.

Для осадения личинок нами были использованы диски диаметром 12 см, длина втулки – 2 см (рис. 54). На каждой стороне диска оседает по 60 экз. спата; следовательно, на диске в среднем будет находиться 120 экз. спата устриц. Для осадения 5 млн экз. педивелигеров нужно:

$$5\,000\,000 / 120 = 42\,000 \text{ дисков.}$$

Коллекторы, изготовленные из дисков в виде гирлянд, можно размещать в ваннах для оседания горизонтально (вариант 1) или вертикально (вариант 2).



**Рисунок 54.** Диски из пищевой пластмассы: А – верхняя сторона; Б – нижняя сторона с втулкой

*Вариант 1 (горизонтальное расположение гирлянд).*

Длина ванны – 2 м, ширина 1,2 м, высота – 1 м, объём – 2,4 м<sup>3</sup>. Гирлянды натягиваются горизонтально на специальные рамы, которые затем вместе с коллекторами устанавливаются в ванны. Длина гирлянды (без учёта длины поводков) – 1900 мм. Всего на гирлянде 95 дисков (1900 / 20 = 95). По ширине ванны размещаются 10 рядов (120 см / 12 см = 10), а по высоте – 7 линий коллекторов (90 см / 12 см = 7). Всего в ванне помещается:

$$95 \times 10 \times 7 = 6650 \text{ дисков.}$$

Для размещения всех дисков понадобится:  $42\,000 / 6650 = 7$  ванн. Оседание личинок, а также рост спата не равномерны, поэтому некоторые ванны будут использоваться повторно; таким образом, общее количество ванн составляет 6. Оптимальная плотность посадки личинок при оседании – 1000 лич.·л<sup>-1</sup>, объём ванны – 2400 л. Если всех педивелигеров разместить в 6 ваннах ( $\approx 14\,000$  л), плотность посадки личинок составит 714 лич.·л<sup>-1</sup> ( $10\,000\,000$  лич. /  $14\,000$  л = 714). В ванне размещается 6650 дисков, на каждом из которых 120 экз. спата. В одной ванне будет находиться около 798 000 экз. спата ( $120 \times 6650 = 798\,000$ ).

Общий объём воды в 6 ваннах:  $2,4 \times 6 = 14,4$  м<sup>3</sup>. Смена воды в ваннах происходит через двое суток. Таким образом, суточный расход морской профильтрованной воды при подращивании спата составит 7,2 м<sup>3</sup>.

*Вариант 2 (вертикальное расположение гирлянд).*

Длина ванны – 2 м, ширина – 1,2 м, высота – 1 м (заполняется водой до 90 см), объём – 2,16 м<sup>3</sup>. Диаметр диска для оседания – 12 см; длина втулки диска – 2,0 см. На одной гирлянде размещается 45 дисков (90 см / 2,0 см = 45). При расположении коллекторов вдоль длины ванны количество гирлянд в одном ряду составит 17:  $200 \text{ см} / 12 \text{ см} \approx 17$  гирлянд; количество рядов – 10 (120 / 12 = 10 рядов). Следовательно, в одной ванне можно разместить 7650 дисков ( $45 \times 17 \times 10 = 7650$ ).

Для оседания 5 млн экз. спата понадобится 42 000 дисков, а значит, при вертикальном расположении гирлянд потребуется 6 ванн ( $42\ 000 / 7650 = 5,5$ ). Это такое же количество, как в первом варианте.

Таким образом, суточный расход морской профильтрованной воды при осаждении личинок составит  $7,2\text{ м}^3$ .

### 6.1.3. Потребление фильтрованной воды при осаждении личинок на крупку

В европейских питомниках в качестве коллекторов используют крупку, распределяя её на дне пластиковых цилиндров, дно которых затянато ситом с размером ячеей 200 мкм. Цилиндры устанавливают в лотки с морской водой. Согласно нормативам, на дно цилиндра рассыпают крупку (размерами 250–300 мкм) из расчёта 130 мг крупки на  $1\text{ см}^2$  сита (рис. 55).

Для осаждения 1 млн педивелигеров требуется два цилиндра диаметром 50 см. Внутренняя поверхность боковых стенок цилиндра, для предотвращения оседания на стенки, покрывается слоем парафина. Для осаждения 10 млн педивелигеров потребуется 20 цилиндров, которые можно разместить в лотках шириной 70 см и общей длиной 12 м. Для работы удобно использовать два лотка, длиной по 6 м, шириной 0,7 м и высотой 0,5 м. Объём такого лотка равен:  $6 \times 0,7 \times 0,5 = 2,1\text{ м}^3$ .



Рисунок 55. Крупка – субстрат для осаждения личинок (увеличение  $\times 50$ )

Следовательно, для осаждения личинок на крупку при использовании двух лотков понадобится в сутки 4688 л фильтрованной воды:

$$4200 + 288 (\text{корм}) + 200 (\text{ополаскивание}) = 4688\text{ л.}$$

### 6.2. Расчёт количества микроводорослей на каждом этапе выращивания личинок и спата

Личинок на стадии велигера кормят микроводорослью *I. galbana* при концентрации корма 50–100 тыс. кл. $\cdot\text{мл}^{-1}$ . При плотности посадки личинок в баке 20 000 лич. $\cdot\text{л}^{-1}$  необходимо задавать концентрацию корма 100 тыс. кл. $\cdot\text{мл}^{-1}$ , объём воды в баке – 1000 л. Необходимое количество корма:

$$100\ 000\text{ кл.}\cdot\text{мл}^{-1} \times 1\ 000\ 000\text{ мл} = 10^5 \times 10^6 = 10^{11}\text{ кл.}$$

Концентрация клеток в культуре – 10 млн кл.·мл<sup>-1</sup> (10<sup>7</sup> кл.·мл<sup>-1</sup>). Ежедневный объём культуры, подаваемый в один бак с личинками:

$$10^{11} \text{ кл.} / 10^7 \text{ кл.·мл}^{-1} = 10^4 \text{ мл (или 10 л)}.$$

По мере роста и развития личинок их плотность посадки снижают. В рацион целесообразно включить следующие виды водорослей: *I. galbana*, *M. lutheri*, *C. calcitrans*, *S. costatum*, *P. tricornutum*, *T. suecica*, *T. viridis*, *R. salina*. На стадии великонхи плотность посадки личинок составляет 5000 лич.·л<sup>-1</sup>. Корм состоит: *I. galbana* + *C. calcitrans* концентрации 150 тыс. кл.·мл<sup>-1</sup>.

Например, общее количество выращиваемых личинок – 15 000 000. Объём воды в баках с личинками:

$$15\,000\,000 \text{ лич.} / 5000 \text{ лич.·л}^{-1} = 3000 \text{ л (3 бака)}.$$

Ежедневно требуемое количество корма – 45 × 10<sup>10</sup> клеток:

$$150\,000 \text{ кл.·мл}^{-1} \times 3\,000\,000 \text{ мл} = 15 \times 10^4 \times 3 \times 10^6 = 45 \times 10^{10} \text{ кл.}$$

Если общая концентрация клеток в культуре – 5 млн кл.·мл<sup>-1</sup> (или 5 × 10<sup>6</sup> кл.·мл<sup>-1</sup>), то ежедневно выдаваемый объём культуры составит:

$$45 \times 10^{10} \text{ кл.} / 5 \times 10^6 \text{ кл.·мл}^{-1} = 9 \times 10^4 \text{ л} = 90 \text{ л}.$$

При выращивании личинок на стадии педивелигера оптимальная плотность посадки – 2000 лич.·л<sup>-1</sup> в объёме воды **5000 л** (в 5 баках). Корм состоит из *I. galbana* + *C. calcitrans* + *T. suecica* в суммарной концентрации 200 тыс. кл.·мл<sup>-1</sup> или *I. galbana* + *P. tricornutum* + *T. suecica* – 200 тыс. кл.·мл<sup>-1</sup>. Ежедневная норма корма для личинок в 5 баках – 10<sup>11</sup> клеток:

$$200\,000 \text{ кл.·мл}^{-1} \times 5\,000\,000 \text{ мл} = 10^{11} \text{ кл.}$$

Если общая концентрация клеток микроводорослей – 5 млн кл.·мл<sup>-1</sup> (или 5 × 10<sup>6</sup> кл.·мл<sup>-1</sup>), то ежедневный объём корма – 200 л:

$$10^{11} \text{ кл.} / 5 \times 10^6 \text{ кл.·мл}^{-1} = 2 \times 10^5 \text{ мл} = 200 \text{ л}.$$

При оседании педивелигеров оптимальный состав корма – *I. galbana*, *C. calcitrans*, *P. tricornutum*, *T. suecica*, *S. costatum*, *R. salina* в концентрации 300 тыс. кл.·мл<sup>-1</sup>. В каждую ванну объёмом 2400 л следует ежедневно внести 72 × 10<sup>10</sup> клеток микроводорослей:

$$24 \times 10^5 \text{ мл} \times 3 \times 10^5 \text{ кл.·мл}^{-1} = 72 \times 10^{10}.$$

При общей концентрации клеток водорослей 5 × 10<sup>6</sup> кл.·мл<sup>-1</sup> объём корма составит 144 л:

$$72 \times 10^{10} \text{ кл.} / 5 \times 10^6 \text{ кл.·мл}^{-1} = 14,4 \times 10^4 \text{ мл} = 144 \text{ л}.$$

Следовательно, при горизонтальном расположении коллекторов в 6 ваннах со спатом потребуется **864 л** водорослей (144 × 6 = 864). При вертикальном расположении коллекторов в 6 ваннах также потребуется **864 л** микроводорослей.

Подращивание спата осуществляется в тех же ваннах объёмом 2400 л, в которых происходило оседание педивелигеров. В одной ванне – 1 000 000 экз. спата. С момента оседания спата и в течение 5 сут. выращивания (размер спата – 1,1 мм) рацион состоит из *I. galbana*, *C. calcitrans*, *P. tricornutum*, *T. suecica*, *S. costatum*, *R. salina* при оптимальной концентрации 350 тыс. кл.·мл<sup>-1</sup>.

Если общая концентрация клеток микроводорослей – 5 млн кл.·мл<sup>-1</sup> ( $5 \times 10^6$  кл.·мл<sup>-1</sup>), то ежедневно выдаваемый объём корма на одну ванну составит 168 л:

$$24 \times 10^5 \text{ мл} \times 3,5 \times 10^5 \text{ кл.·мл}^{-1} / 5 \times 10^6 \text{ кл.·мл}^{-1} = \\ = 16,8 \times 10^4 \text{ мл} = 168\,000 \text{ мл} = 168 \text{ л.}$$

Следовательно, для 5 млн экз. спата (**в 6 ваннах**) потребуется **1008 л** микроводорослей.

В течение следующих 6 сут. подращивания спата (размер – 2 мм) проводится при аналогичном составе микроводорослей, но при увеличении концентрации до 400 тыс. кл.·мл<sup>-1</sup>, ежедневный объём корма на одну ёмкость составит **192 л**:

$$24 \times 10^5 \text{ мл} \times 4 \times 10^5 \text{ кл.·мл}^{-1} / 5 \times 10^6 \text{ кл.·мл}^{-1} = \\ = 19,2 \times 10^4 \text{ мл} = 192\,000 \text{ мл} = 192 \text{ л;}$$

**на 6 ванн – 1152 л** микроводорослей.

На 14-е сутки подращивания, когда средний размер спата равен 3 мм, оптимальная концентрация микроводорослей составляет 500 тыс. кл.·мл<sup>-1</sup>. Ежедневный объём корма на одну ванну – **240 л**:

$$24 \times 10^5 \text{ мл} \times 5 \times 10^5 \text{ кл.·мл}^{-1} / 5 \times 10^6 \text{ кл.·мл}^{-1} = 240 \text{ л;}$$

**на 6 ванн – 1440 л** микроводорослей.

### **6.3. Расчёт общего объёма ежедневно потребляемой морской воды**

Расчёт суточного потребления морской воды необходим для определения производительности насосов, фильтров, ультрафиолетового стерилизатора, а также объёмов бассейна-накопителя и ёмкости запаса фильтрованной воды.

Расчёт производится отдельно для двух вариантов:

- 1) осаждение личинок на коллекторы, изготовленные из дисков;
- 2) осаждение личинок на крупку.

При выращивании личинок используются сравнительно небольшие ёмкости, а значит, расход воды будет меньше, чем при осаждении личинок и подращивании спата. Поэтому при осаждении личинок и подращивании спата необходимы ещё и ёмкости для фильтрованной и стерилизованной морской воды.

### 6.3.1. Общий объём ежедневно потребляемой фильтрованной морской воды

Объём потребляемой воды равен суммарному объёму, состоящему из фильтрованной и нефилтрованной морской воды.

#### 6.3.1.1. Потребление фильтрованной морской воды при выращивании личинок и осажении их на коллекторы

Выращивание личинок.

*Стадия велигера* – 1 бак:

1000 л + 10 л (корм) + 50 л (ополаскивание) = **1060 л.**

*Стадия великонхи* – 3 бака:

3000 л + 90 л (корм) + 150 л (ополаскивание) = **3240 л.**

*Стадия педивелигера* – 5 баков:

5000 л + 200 л (корм) + 250 л (ополаскивание) = **5450 л.**

Осаждение личинок. За сутки до осажения личинок заполняется ёмкость запаса фильтрованной водой объёмом 8 м<sup>3</sup>, достаточным для заполнения трёх ванн (7200 л). В день проведения осажения личинок на коллекторы используются шесть ванн, причём три из них заполняются из ёмкости запаса, а другие три – из бассейна-накопителя. Поэтому в день оседания личинок расход воды из бассейна-накопителя составит 7200 л.

Общий объём профильтрованной морской воды при осажении личинок в 6 ваннах – **8564 л:**

7200 л + 864 л (корм) + 500 л (ополаскивание) = **8564 л.**

Подращивание спата. Спат подращивается в 6 ваннах, но смена воды в ваннах производится через сутки, поэтому в каждые сутки водой заполняются 3 ванны. Корм выдаётся в 6 ванн ежесуточно.

*Подращивание спата до 1 мм* (3 + 3 ванны):

7200 л + 1008 л (корм) + 500 л (ополаскивание) = **8708 л.**

*Подращивание спата до 2 мм* (3 + 3 ванны):

7200 л + 1152 л (корм) + 500 л (ополаскивание) = **8852 л.**

*Подращивание спата до 3 мм* (3 + 3 ванны):

7200 л + 1440 л (корм) + 500 л (ополаскивание) = **9140 л.**

Итоговые данные по **максимальному** ежедневному потреблению фильтрованной морской воды: выращивание личинок – **5450 л**; осажение личинок – **8564 л**; подращивание спата – **9140 л.**

### **6.3.2. Расчёт общего объёма ежедневно потребляемой фильтрованной и нефilterованной морской воды**

Нефильтрованная морская вода используется в питомнике в течение всего периода кондиционирования производителей. Скорость протока воды должна быть не ниже  $25 \text{ мл} \cdot \text{экз.} \cdot \text{мин}^{-1}$ . Поэтому суточное потребление воды для кондиционирования 150 экз. производителей составит  $5400 \text{ л} \cdot \text{сут}^{-1}$ :

$$(150 \text{ экз.} \times 25 \text{ мл} \times 60 \times 24) / 1000 = \mathbf{5400 \text{ л} \cdot \text{сут}^{-1}}.$$

Таким образом, **максимальное** суточное потребление морской воды в питомнике – **фильтрованной + нефilterованной** – составит:

$$9140 + 5400 = \mathbf{14\ 540 \text{ л} \cdot \text{сут}^{-1}}.$$

Суточное потребление морской воды питомником, равное  $14\ 540 \text{ л} \cdot \text{сут}^{-1}$ , принимаем в качестве задающей величины при подборе основного оборудования: насосов, бассейна-накопителя, фильтров и трубопроводов.

### **6.3.3. Потребление морской воды при осажении личинок на крупку**

Этап выращивания личинок до момента осажения на крупку аналогичен таковому до момента осажения на диски.

В течение 4–7 сут. спат подращивается в тех же лотках, в которых проходило оседание, но дно цилиндров затянато сетью с диаметром ячеей 1–2 мм. Увеличиваются только объёмы выдаваемого корма, что существенно не влияет на весь объём расходуемой фильтрованной морской воды. В последующие дни спат подращивается в проточных лотках, причём нефilterованная вода поступает в лотки непосредственно из моря.

### **6.4. Подбор основного оборудования питомника**

Как уже отмечалось, морскую воду из скважины подают непосредственно на производственные участки, без запаса её в бассейне-накопителе. Здесь мы рассматриваем более сложный вариант – забор воды непосредственно из моря.

Если качество воды в море не всегда соответствует требованиям, приходится пользоваться водой запаса. Величина объёма запаса воды зависит от величины суточного потребления воды питомником и продолжительности неблагоприятного периода. Допустим, что этот период длится не более 5 сут. Взяв в основу расчёта суточный расход воды и продолжительность неблагоприятного периода, определим производительность насосов и объём бассейна-накопителя.



#### 6.4.1. Оборудование, используемое при выращивании личинок и осадении их на диски

Объём запасённой воды должен быть **72,5 м**:

$$14,5 \text{ м}^3 \times 5 = 72,5 \text{ м}^3.$$

Следовательно, объём бассейна-накопителя должен составлять не менее  $75 \text{ м}^3$ .

Насос, подающий воду из моря, должен обеспечить заполнение бассейна в течение рабочего дня. Выбираем насос производительностью  $15 \text{ м}^3 \cdot \text{ч}^{-1}$ , который заполнит бассейн в течение 5 часов. Насос может быть погружным либо центробежным, установленным на берегу в помещении. Предпочтительнее погружной насос: он работает практически бесшумно; кроме того, отсутствует возможность попадания воздуха в насос. Однако не везде имеется возможность надёжной установки насоса под водой. Если питомник расположен у защищённого берега (на берегу бухты) и рядом есть причал, к опоре которого можно прикрепить насос, то следует выбрать погружной насос. Такой насос можно установить и в приямке, сделанном вблизи береговой полосы.

Напомним, что вся система подачи воды (насос и трубопровод) должна быть продублирована. Вода в бассейне аэрируется с помощью эрлифта, который обеспечивает насыщение воды воздухом, а также её перемешивание за счёт подъёма воды из придонного слоя к поверхности.

Из бассейна вода поступает в распределительный насос, подающий воду на песчаный фильтр. Производительность насоса распределения воды и песчаного фильтра должны обеспечить максимальный суточный расход воды в питомнике равный  $15 \text{ м}^3$ . Вода в течение рабочего дня расходуется неравномерно, а значит, производительность распределительного насоса и песчаного фильтра должна быть не менее  $5 \text{ м}^3 \cdot \text{ч}^{-1}$ . Несколько завышенная производительность насоса и песчаного фильтра необходимы при заполнении морской фильтрованной водой ёмкости запаса и ванн для осадения личинок.

Система подачи воды от бассейна и до фильтров-картриджей также дублируется.

Вода, прошедшая через песчаный фильтр, поступает на следующие участки: выращивания личинок, культивирования микроводорослей, осадения личинок на коллекторы, подращивания спата, а также на участки кондиционирования производителей и проведения искусственного нереста.

Основное оборудование участка выращивания личинок: баки объёмом 1000 л – 10 шт.; пластиковая ёмкость с крышкой для воды объёмом 8000 л; набор фильтров-картриджей с диаметром пор не более 2 мкм; проточный ультрафиолетовый стерилизатор производительностью  $5 \text{ м}^3 \cdot \text{ч}^{-1}$ , а также набор сит для 5 баков.

Основное оборудование для участка проведения осадения личинок: ванна объёмом 2400 л – 8 шт. (6 рабочих и 2 вспомогательных); пластиковая

ёмкость с крышкой объёмом 8000 л; теплообменник; набор фильтров-картриджей с диаметром пор не более 2 мкм; проточный ультрафиолетовый стерилизатор производительностью 5 м<sup>3</sup>·ч<sup>-1</sup>.

Наружные трубопроводы – диаметром 60 мм; внутренние трубопроводы (после бассейна) – 40 мм.

Количество дисков – субстрата для оседания 5 млн экз. спата за один цикл выращивания – 42 000 шт.

Основное оборудование для культивирования кормовых микроводорослей включает: фильтры-картриджи (до 1 мкм); лампы дневного света (белый свет), мощностью от 15 до 25 кВт; стеклянные или пластиковые баллоны объёмом 20 л – 21 шт.; баки объёмом 300 л – 50 шт. Данные расчётов необходимого количества баков представлены в табл. 11.

Максимальный объём потребляемых микроводорослей в сутки – 1500 л (5 баков). Продолжительность наращивания водорослей до момента потребления для разных видов водорослей составляет от 7 до 10 дней.

Следовательно, общее количество баков на весь период выращивания – **50 шт.** (5 × 10 = 50).

**Таблица 11.** Результаты расчёта количества корма на каждом этапе выращивания личинок и спата в питомнике производительностью 5 млн экз. спата за нерест

№	Этапы выращивания личинок и спата	Продолжительность развития личинок и спата, сут.	Ежедневный объём потребляемых водорослей, л	Суммарный объём водорослей на каждом этапе выращивания, л	Количество баков объёмом 300 л, шт.
1	Велигеры	8	20	160	1
2	Великонхи	8	90	720	3
3	Педивелигеры	4	200	800	3
4	Осаждение	3	900	2700	9
5	Спат, 1 мм	5	1000	5000	17
6	Спат, 2 мм	6	1150	6900	23
7	Спат, 3 мм	3	1500	4500	15

#### **6.4.2. Оборудование, используемое при выращивании личинок и осажении их на крупку**

В питомнике производительностью 5 млн экз. спата за нерест при осажении на крупку максимальный суточный расход воды – 5450 л – происходит на этапе выращивания педивелигеров. Вторая статья расхода – кондиционирование производителей – 5400 л·сут<sup>-1</sup>.

Следовательно, максимальный суточный расход морской воды – 10,85 м<sup>3</sup>, что позволяет снизить объём бассейна-накопителя до 55 м<sup>3</sup>, а производительность насоса, закачивающего воду в бассейн, – до 10 м<sup>3</sup>·ч<sup>-1</sup>.

Другое необходимое оборудование:

- бак для выращивания личинок (объём 1000 л) – 10 шт.;
- лоток (ширина – 0,7 м; высота – 0,5 м, длина – 6 м) – 2 шт.;
- цилиндр (диаметр – 0,5 м, для осажения личинок) – 20 шт.;
- цилиндр (диаметр – 0,5 м, для подращивания спата) – 20 шт.;
- бак объёмом 300 л для наращивания водорослей – 9 шт.

После осажения на крупку спат подращивается в проточной воде с использованием в качестве корма природного фитопланктона, но с добавлением культивируемых микроводорослей.

Всё остальное основное оборудование аналогично оборудованию, описанному в разделе 6.4.1.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Растущий спрос на морепродукты, включая двустворчатых моллюсков, сохранится и в будущем, поэтому их производство в аквахозяйствах будет увеличиваться. Необходимость организации устричного питомника на Чёрном море станет со временем ещё более очевидной, однако для организации и функционирования питомника требуются не только финансовые вложения, но и знания о структуре питомника, особенностях производственного цикла и основах биологии выращиваемых объектов и т. д.

Важно отметить, что специалисты по аквакультуре двустворчатых моллюсков считают, что выращивание моллюсков, особенно получение их жизнестойкой молоди в питомниках основано на знании биологии вида. Освоить эту профессию можно только на практике. Так, авторы учебника *Hatchery culture of bivalves* утверждают, что решающими факторами, влияющими на успешность работы устричного питомника, являются не только его размеры или оснащённость современным дорогостоящим оборудованием, но и компетентность, и деловые качества руководителя, а также заинтересованность и инициативность квалифицированных исполнителей. Предлагаемое «Руководство» – это первый шаг на пути организации питомника на Чёрном море. Вся базовая информация, необходимая для планирования и выполнения работ по организации устричного питомника, содержится в данной книге.

Для решения научных задач развивающейся аквакультуры будет полезно сотрудничество с исследовательскими учреждениями. Известно, что селекционное разведение является наиболее распространённой формой генетического улучшения, однако до сих пор разводится дикий тип большинства видов устриц, т. е. не одомашненный или генетически не улучшенный. Необходимы обширные исследования по подбору маточного стада гигантской устрицы и применению генетических методов для выведения линий и рас, адаптированных к конкретной среде обитания. Производство триплоидных устриц уже принесло большую пользу отрасли во многих странах мира. Однако закрепление наследуемых хозяйственно-ценных признаков, таких как темп роста и устойчивость к заболеваниям, которые могут эффективно поддерживаться только путём выращивания устриц в питомниках, всегда будет актуально при их разведении. Немаловажную роль при этом будет играть технология телекаптажа.

При государственной финансовой поддержке на базе питомника возможна организация Регионального центра марикультуры. В таком центре черноморские фермеры могли бы получать квалифицированную помощь при решении возникающих производственных проблем; проходить обучение и практику по выращиванию морских беспозвоночных; знакомиться с новыми технологиями аквакультуры.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лисицкая Е. В., Щуров С. В. Роль полихет в сообществе обрастания на мидийно-устричных фермах (Крым, Чёрное море) // Вопросы рыболовства. 2020. Т. 21, № 1. С. 74–83.
2. Орленко А. Н. Основные результаты работ по акклиматизации и культивированию гигантской устрицы *Crassostrea gigas* (Th.) в Чёрном море за период 1985–2004 гг. // Рыбное хозяйство Украины. 2005. Спец. вып. 6. С. 178–180.
3. Раков В. А. Биологические основы культивирования тихоокеанской устрицы *Crassostrea gigas* (Thunberg) в заливе Петра Великого : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.18 / Академия наук СССР, Дальневосточный научный центр, ТИНРО. Владивосток, 1984. 24 с.
4. ФАО, 2012. Состояние мирового рыболовства и аквакультуры. Рим, 2012. 261 с.
5. ФАО, 2016. Состояние мирового рыболовства и аквакультуры. Вклад в обеспечение всеобщей продовольственной безопасности и питания. Рим, 2016. 216 с.
6. Хребтова Т. В., Моница О. Б. Культивирование черноморской и акклиматизация тихоокеанской устриц в Чёрном море // Биологические основы аквакультуры в морях европейской части СССР. Москва : Наука, 1985. С. 180–185.
7. Холодов В. И., Пиркова А. В., Ладыгина Л. В. Выращивание мидий и устриц в Чёрном море / под ред. В. И. Рябушко ; 2-е изд., доп. Воронеж : ООО «Издатель-Принт», 2017. 508 с.
8. Beaumont A. R., Fairbrother J. E. Ploidy manipulation in molluscan shellfish: A review // Journal of the Shellfish Research. 1991. Vol. 10, no. 1. P. 1–18.
9. Brown M. R. The amino acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture // Aquaculture. 1991. Vol. 145, iss. 1. P. 79–99. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(91\)90007-J](https://doi.org/10.1016/0022-0981(91)90007-J)
10. Buestel D., Ropert M., Prou J., Gouletquer P. History, status, and future of oyster culture in France // Journal of the Shellfish Research. 2009. Vol. 28, no. 4. P. 813–820. <https://doi.org/10.2983/035.028.0410>
11. Chaiton J. A., Allen S. K. Jr. Early detection of triploidy in the larvae of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, by flow cytometry // Aquaculture. 1985. Vol. 48, iss. 1. P. 35–43. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(85\)90050-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(85)90050-X)

12. Chanley P., Dinamani P. Comparative descriptions of some oyster larvae from New Zealand and Chile, and a description of a new genus of oyster, *Tiostrea* // New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research. 1980. Vol. 14, iss. 2. P. 103–120. <https://doi.org/10.1080/00288330.1980.9515851>
13. Coatanea D., Oheix J., Mazzara L., Hamon P.-Y. Esseas de telecaptage de l'huitre plate *Ostrea edulis* en Mediterranee // Rapport internes de la Direction des Ressources Vivantes de L'IFREMER. 1991. 57 p.
14. Coon S. L., Weiner R. M. Induction of settlement and metamorphosis of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), by L-DOPA and catecholamine's // Journal Experimental Marine Biology and Ecology. 1985. Vol. 94, iss. 1–3. P. 211–221. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(85\)90059-0](https://doi.org/10.1016/0022-0981(85)90059-0)
15. Downing S. L., Allen S. K. Jr. Induced triploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, optimal treatments with cytochalasin B depend on temperature // Aquaculture. 1984. Vol. 61, iss. 1. P. 1–15. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90332-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90332-2)
16. EFSA. Scientific opinion on health benefits of seafood (fish and shellfish) consumption in relation to health risks associated with exposure to methylmercury // European Food Safety Authority (EFSA) Journal. 2014. Vol. 12, no. 7. P. 80. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3761>
17. FAO, 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 : Meeting the sustainable development goals. Rome : FAO, 2018. 227 p. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf>
18. Guillard R., Smith M. L., Chanley M. H. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates // Culture of Marine Invertebrates Animals. New York : Plenum Press, 1975. P. 29–60. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9\\_3](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3)
19. Guo X., DeBrosse G. A., Allen S. K. Jr. All-triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids // Aquaculture. 1996. Vol. 142, iss. 3–4. P. 149–161. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01243-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01243-5)
20. Helm M. M., Bourne N., Lovatelli A. Hatchery culture of bivalves. A practical manual. Rome : FAO, 2004. 177 p. (FAO Fisheries Technical Paper ; no. 471).
21. Jeffries V. E. Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* // Aquaculture. 1983. Vol. 29, iss. 3–4. P. 201–226. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(82\)90136-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(82)90136-3)
22. Joly J.-P., Bodoy A.I., Baud J.-P. Guide du telecaptage de larves d'huîtres *Crassostrea gigas* // Rapports internes de la Direction des Ressources Vivantes de l'IFREMER. 1989. 36p. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00048/15901/13329.pdf>

23. Lananan F., Jusoh A., Ali N., Lam S. S., Endut A. Effect of Conway Medium and f/2 Medium on the growth of six genera of South China Sea marine microalgae // *Bioresource Technology*. 2013. Vol. 141. P. 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.006>
24. Ludi Parwadani Aji. The use of algae concentrates, dried algae and algal substitutes to feed bivalves // *Makara Saints*. 2011. Vol. 15, no. 1. P. 1–9.
25. Noventa S., Correia A., Hacker C., Drago C. Gold nanoparticles ingested by oyster larvae are internalized by cells through an alimentary endocytic pathway // *Nanotoxicology*. 2018. Vol. 12, iss. 8. P. 901–913. <https://doi.org/10.1080/17435390.2018.1487601>
26. Quillet E., Panelay P. J. Triploidy induction by thermal shocks in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas* // *Aquaculture*. 1986. Vol. 57, iss. 1–4. P. 271–279. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(86\)90205-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(86)90205-X)
27. Rapport d'activite 1997 du laboratoire Genetique aquaculture et Pathologie. Station IFREMER, La Tremblad (France). 1997. 54 p.
28. Robert R., Gerard A. Bivalve hatchery technology: The current situation for the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, and the scallop *Pecten maximus* in France // *Aquatic Living Resources*. 1999. Vol.12, no. 2. P. 121–130.
29. Sorgebous L. P. Manual of the production and use of live food for aquaculture. Rome : FAO, 1996. 295 p. (FAO Fisheries Technical Paper; no. 361).
30. SRAC, 2013. Phytoplankton Culture for Aquaculture Feed. This factsheet published by the Southern Regional Aquaculture Center (SRAC) gives information on phytoplankton culture for aquaculture feed. SRAC, 2013. <https://thefishsite.com/articles/phytoplankton-culture-for-aquaculture-feed>
31. Stanley J. G., Allen Jr. S. K., Hidu H. Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B // *Aquaculture*. 1981. Vol.23. P.1–10. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(81\)90002-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(81)90002-8)
32. Stiles S., Choromanski J. Trends in genetics of bivalve mollusks: A review // *International Council for the Exploration of the Sea*. 2002. 28 p. (C.M. 2002/U:11 Mariculture Committee). <http://www.ices.dk/sites/pub/CM%20Documents/2002/U/U1102.pdf>
33. Utting S. D., Millican P. F. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve brood stocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability // *Aquaculture*. 1997. Vol. 155, iss. 1–4. P. 45–54. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00108-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00108-7)
34. Vogeler S., Bean T. P., Lyons B. P., Galloway T. S. Dynamics of nuclear receptor gene expression during Pacific oyster development // *BMC Developmental Biology*. 2016, vol. 16, no. 1. P. 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12861-016-0129-6>

35. Waldock M. J., Holland D. L. Fatty acid metabolism in young oysters, *Crassostrea gigas*: Polyunsaturated fatty acids // *Lipids*. 1984. Vol. 19, article no. 332. P. 332–336. <https://doi.org/10.1007/BF02534783>
36. Wijsman J. W. M., Troost K., Fang J., Roncarati A. Global Production of Marine Bivalves. Trends and Challenges // *Global Production of Marine Bivalves* / Eds.: A. C. Smaal, J. C. Ferreira, J. Grant, J. K. Petersen, Ø. Strand. Cham, Switzerland : Springer, 2018. P. 7–26. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-96776-9\\_2](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-96776-9_2)
37. World Bank. Aquaculture: Changing the face of the waters – meeting the promise and challenge of sustainable aquaculture. Washington, DC : World Bank, 2006. 148 p. (Report, 2006. No. 36622-GBL). <http://documents.worldbank.org/curated/en/344981468174865210/Aquaculture-changing-the-face-of-the-waters-meeting-the-promise-and-challenge-of-sustainable-aquaculture>



## СПИСОК ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бардач Дж., Риттер Дж., Макларни У. Аквакультура: разведение и выращивание пресноводных и морских организмов / пер. с англ. А. Д. Гершановича, К. М. Михлиной ; под ред. Т. М. Аронович. Москва : Пищевая промышленность, 1978. 294 с.
2. Милн П. Х. Морские хозяйства в прибрежных водах = Fish and shellfish farming in coastal waters / пер. с англ. Т. Т. Костроминой [и др.] ; под ред. Л. В. Спектровой, З. П. Орловой. Москва : Пищевая промышленность, 1978. 197 с.
3. Уитон Ф. Техническое обеспечение аквакультуры = Aquacultural engineering / пер. с англ. Р. В. Рынской [и др.] ; под ред. В. В. Сапожникова, Т. М. Аранович. Москва : Агропромиздат, 1985. 528 с.
4. Томас-Бургнеф М., Молло П. Планктон и аспекты морепользования / пер. с фр. В. И. Холодова ; под ред. В. Н. Еремеева ; НАНУ, ИнБЮМ. Севастополь : [ООО «РУБЭСТ»], 2011. 281 с.

# СОДЕРЖАНИЕ

<b>Введение</b> .....	5
<b>Глава 1. Мировая конхиокультура</b> .....	6
<i>А. В. Пиркова</i>	
<b>Глава 2. Биологические основы устрицеводства</b> .....	9
<i>А. В. Пиркова, Л. В. Ладыгина</i>	
2.1 Биология гигантской устрицы <i>Crassostrea gigas</i> .....	9
2.1.1. Половое созревание и нерест гигантских устриц .....	9
2.1.2. Эмбриональное и личиночное развитие гигантской устрицы .....	11
2.1.3. Пищеварительная система личинок и спата гигантской устрицы .....	16
2.2. Биология микроводорослей .....	18
2.2.1. Морфология и анатомия одноклеточных водорослей .....	18
2.2.2. Размножение водорослей .....	23
2.2.3. Питание водорослей .....	25
2.2.4. Кормовые микроводоросли .....	26
<b>Глава 3. Технологические аспекты устрицеводства</b> .....	31
<i>Л. В. Ладыгина, В. И. Холодов, А. В. Пиркова</i>	
3.1. Получение и выращивание личинок и спата гигантской устрицы .....	31
3.1.1. Отбор и кондиционирование производителей .....	31
3.1.2. Нерест и оплодотворение яйцеклеток .....	34
3.1.3. Выращивание личинок .....	37
3.1.3.1. Проточный метод выращивания личинок .....	41
3.1.4. Питание личинок и спата устриц .....	41
3.1.4.1. Расчёт объёмов кормовых водорослей для личинок на разных стадиях развития .....	44
3.1.5. Метаморфоз личинок .....	44
3.1.6. Причины смертности личинок .....	46
3.1.7. Оседание личинок гигантской устрицы .....	47
3.1.7.1. Проведение осаждения личинок в питомнике ФИЦ ИнБЮМ .....	49
3.1.8. Питание спата гигантской устрицы в питомнике .....	49
3.1.9. Телекаптаж .....	51
3.2. Культивирование одноклеточных водорослей .....	57
3.2.1. Факторы, влияющие на рост микроводорослей .....	58
3.2.2. Процесс культивирования микроводорослей .....	61
3.2.3. Фазы роста микроводорослей .....	67

3.2.4. Режимы культивирования микроводорослей .....	68
3.2.4.1. Причины гибели микроводорослей при культивировании .....	70
3.2.5. Определение концентрации клеток микроводорослей .....	71
3.2.6. Концентрированные корма .....	72
<b>Глава 4. Улучшение товарного качества гигантской устрицы генетическими методами .....</b>	<b>75</b>
<i>А. В. Пиркова, Л. В. Ладыгина</i>	
4.1. Полиплоидия .....	75
4.1.1. Получение полиплоидов в питомнике ФИЦ ИнБЮМ .....	77
4.2. Эколого-географическое направление селекции гигантской устрицы .....	78
<b>Глава 5. Устричный питомник .....</b>	<b>84</b>
<i>В. И. Холодов, А. В. Пиркова, Л. В. Ладыгина</i>	
5.1. Подготовительные работы перед строительством питомника .....	84
5.2. Выбор места для размещения питомника .....	85
5.3. Общие сведения о структуре типового устричного питомника .....	86
5.4. Водоподготовка и распределение морской воды .....	87
5.5. Участок культивирования микроводорослей .....	90
5.6. Участок содержания маточного стада и проведения нереста .....	91
5.7. Участок выращивания личинок гигантской устрицы .....	92
5.8. Участок подращивания спата .....	93
5.9. Аэрация морской воды .....	95
<b>Глава 6. Определение основных параметров устричного питомника и подбор основного оборудования для его оснащения .....</b>	<b>96</b>
<i>В. И. Холодов</i>	
6.1. Расчёт потребления воды .....	96
6.1.1. Потребление фильтрованной воды при выращивании личинок .....	96
6.1.2. Потребление фильтрованной воды при осаднении личинок на коллекторы (диски) .....	97
6.1.3. Потребление фильтрованной воды при осаднении личинок на крупку .....	99
6.2. Расчёт количества микроводорослей на каждом этапе выращивания личинок и спата .....	99

6.3. Расчёт общего объёма ежедневно потребляемой морской воды .....	101
6.3.1. Общий объём ежедневно потребляемой фильтрованной морской воды .....	102
6.3.1.1. Потребление фильтрованной морской воды при выращивании личинок и осаждении их на коллекторы .....	102
6.3.2. Расчёт общего объёма ежедневно потребляемой фильтрованной и нефильтрованной морской воды .....	103
6.3.3. Потребление морской воды при осаждении личинок на крупку .....	103
6.4. Подбор основного оборудования для питомника .....	103
6.4.1. Оборудование, используемое при выращивании личинок и осаждении их на диски .....	104
6.4.2. Оборудование, используемое при выращивании личинок и осаждении их на крупку .....	106
<b>Заключение .....</b>	<b>107</b>
<b>Список литературы .....</b>	<b>108</b>
<b>Список дополнительной литературы .....</b>	<b>112</b>

# CONTENTS

<b>Introduction</b> .....	5
<b>Chapter 1. World conchioculture</b> .....	6
<i>A. V. Pirkova</i>	
<b>Chapter 2. Biological fundamentals of oyster farming</b> .....	9
<i>A. V. Pirkova, L. V. Ladygina</i>	
2.1 Biology of the Pacific oyster <i>Crassostrea gigas</i> .....	9
2.1.1. Ripening and spawning of the Pacific oyster .....	9
2.1.2. Embryonic and larval development of the Pacific oyster .....	11
2.1.3. Digestive system of larvae and spat of the Pacific oyster .....	16
2.2. Biology of microalgae .....	18
2.2.1. Morphology and anatomy of unicellular algae .....	18
2.2.2. Reproduction of algae .....	23
2.2.3. Nutrition of algae .....	25
2.2.4. Microalgae for feed .....	26
<b>Chapter 3. Technological aspects of oyster farming</b> .....	31
<i>L. V. Ladygina, A. V. Pirkova, V. I. Kholodov</i>	
3.1. Production and rearing of larvae and spat of the Pacific oyster .....	31
3.1.1. Selection and conditioning of producers .....	31
3.1.2. Spawning and egg fertilization .....	34
3.1.3. Rearing of larvae .....	37
3.1.3.1. Running water culture of oyster larvae .....	41
3.1.4. Nutrition of oyster larvae and spat .....	41
3.1.4.1. Calculation of feed algae amounts for larvae at different developmental stages .....	44
3.1.5. Larval metamorphosis .....	44
3.1.6. Causes of larval mortality .....	46
3.1.7. Settling of the Pacific oyster larvae .....	47
3.1.7.1. Settling of oyster larvae in the IBSS RAS hatchery .....	49
3.1.8. Nutrition of the Pacific oyster spat in the hatchery .....	49
3.1.9. Telecaptaje .....	51
3.2. Cultivation of unicellular algae .....	57
3.2.1. Factors affecting microalgae growth .....	58
3.2.2. Microalgae cultivation process .....	61
3.2.3. Microalgae growth phases .....	67
3.2.4. Microalgae cultivation regimes .....	68

3.2.4.1. Causes of microalgae death during cultivation .....	70
3.2.5. Determination of microalgae cell concentration .....	71
3.2.6. Feed concentrates .....	72

## **Chapter 4. Improvement of the Pacific oyster marketability**

<b>by genetic methods</b> .....	75
---------------------------------	----

*A. V. Pirkova, L. V. Ladygina*

4.1. Polyploidy .....	75
4.1.1. Polyploidy production in the IBSS RAS hatchery .....	77
4.2. Ecogeographic direction in the Pacific oyster selection .....	78

<b>Chapter 5. Oyster hatchery</b> .....	84
---	----

*V. I. Kholodov, A. V. Pirkova, L. V. Ladygina*

5.1. Preparatory works before the hatchery construction .....	84
5.2. Hatchery placement selection .....	85
5.3. Overview of a typical oyster hatchery structure .....	86
5.4. Sea water treatment and distribution .....	87
5.5. Microalgae cultivation area .....	90
5.6. Broodstock and spawning area .....	91
5.7. Pacific oyster larvae rearing area .....	92
5.8. Spat rearing area .....	93
5.9. Sea water aeration .....	95

## **Chapter 6. Determination of main parameters of oyster hatchery and selection of its basic equipment**

.....	96
-------	----

*V. I. Kholodov*

6.1. Water requirement calculation .....	96
6.1.1. Filtered water consumption for larvae rearing .....	96
6.1.2. Filtered water consumption when settling larvae onto disk collectors .....	97
6.1.3. Filtered water consumption when settling larvae onto oyster shell microblebs .....	99
6.2. Calculation of microalgae amount at each stage of the larvae and spat rearing .....	99
6.3. Calculation of the total volume of daily consumed seawater .....	101
6.3.1. Total volume of daily consumed filtered seawater .....	102
6.3.1.1. Filtered seawater consumption when rearing larvae and settling them onto collectors .....	102
6.3.2. Calculation of the total volume of daily consumed filtered and unfiltered seawater .....	103

6.3.3. Seawater consumption when settling larvae onto oyster shell microblebs .....	103
6.4. Selection of basic equipment for hatchery .....	103
6.4.1. Equipment used for larvae rearing and settling onto disks .....	104
6.4.2. Equipment used for larvae rearing and settling onto oyster shell microblebs .....	106
<b>Conclusions</b> .....	107
<b>References</b> .....	108
<b>List of further reading</b> .....	113





*Научное издание*

**Пиркова А. В., Ладыгина Л. В., Холодов В. И.**

Биологические и биотехнические аспекты  
организации и функционирования  
устричного питомника на Чёрном море

Корректор:  
Копытова О. Ю.

Вёрстка:  
Васильева О. Н.

Подписано в печать 01.12.2020.  
Формат 84x108/16. Печать офсетная.  
Бумага офсетная. Гарнитура Cambria.  
Усл.-печ. л. 12,6. Тираж 300 экз. Заказ № 254

Вёрстка и печать:  
ООО «Полиграфический комплекс «КИА»  
Россия, г. Севастополь, пр. Героев Сталинграда, 51,  
тел. (8692) 42-28-78, e-mail: kia01@mail.ru

ISBN 978-5-6044865-3-5



9 785604 486535