



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A23K 10/00 (2023.02)

(21)(22) Заявка: 2022120132, 21.07.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.07.2022

Дата регистрации:
04.04.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 21.07.2022

(45) Опубликовано: 04.04.2023 Бюл. № 10

Адрес для переписки:

690091, г. Владивосток, пер. Шевченко, 4,
Тихоокеанский филиал Федерального
государственного бюджетного научного
учреждения "Всероссийский научно-
исследовательский институт ("ТИНРО")

(72) Автор(ы):

Дзизюров Виктор Дмитриевич (RU),
Сухин Игорь Юрьевич (RU),
Гостюхина Ольга Борисовна (RU),
Буслов Александр Вячеславович (RU),
Байталюк Алексей Анатольевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение "Всероссийский
научно-исследовательский институт рыбного
хозяйства и океанографии" (ФГБНУ
"ВНИРО") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: M. GARCÍA-GONZ&
AACUTE;LEZ, et al., Conditions for open-air
outdoor culture of Dunaliella salina in southern
Spain", J. Journal of Applied Phycology, 2003, p.
177-184. RU 2663328 C1,03.08.2018. RU 2566672
C1, 27.10.2015.

(54) Способ культивирования одноклеточных микроводорослей *Chaetoceros muelleri* и *Isochrysis galbana* - живого корма для личинок морских беспозвоночных

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Культивирование осуществляют в многократно повторяющихся технологических циклах в течение неограниченного времени. Каждый цикл, длительностью равной 32 суткам, состоит из двух этапов: этапа выращивания инокулята в культиваторах закрытого типа в накопительном режиме и этапа получения кормовой биомассы в культиваторах открытого типа, сначала в накопительном режиме, затем в квазинепрерывном режиме культивирования. Срок начала каждого последующего цикла выращивания водорослей смещен относительно предыдущего на 8 суток. Выращивание

микроводорослей на всех этапах проводят в предварительно подготовленной питательной среде F/2 на основе натуральной морской воды, при круглосуточном освещении с поверхностной освещенностью 14-16 кЛк, температуре 20-23°C, непрерывном барботировании воздухом через аквариумные распылители со скоростью 1,0-1,25 л/мин на 1 л культуры для поддержания pH среды в диапазоне 8,5-8,9. Изобретение позволяет обеспечить неограниченное по времени ежесуточное получение кормовой биомассы микроводорослей *Chaetoceros muelleri* и *Isochrysis galbana* с сохранением их стабильного качества во всех циклах. 2 пр.

R U 2 7 9 3 4 7 1 C 1

R U 2 7 9 3 4 7 1 C 1

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
A23K 10/00 (2023.02)

(21)(22) Application: 2022120132, 21.07.2022

(24) Effective date for property rights:
21.07.2022Registration date:
04.04.2023

Priority:

(22) Date of filing: 21.07.2022

(45) Date of publication: 04.04.2023 Bull. № 10

Mail address:

690091, g. Vladivostok, per. Shevchenko, 4,
Tikhookeanskij filial Federalnogo
gosudarstvennogo byudzhetnogo nauchnogo
uchrezhdeniya "Vserossijskij nauchno-
issledovatelskij institut ("TINRO")

(72) Inventor(s):

Dzizyurov Viktor Dmitrievich (RU),
Sukhin Igor Yurevich (RU),
Gostyukhina Olga Borisovna (RU),
Buslov Aleksandr Vyacheslavovich (RU),
Bajtalyuk Aleksej Anatolevich (RU)

(73) Proprietor(s):

Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
nauchnoe uchrezhdenie "Vserossijskij
nauchno-issledovatelskij institut rybnogo
khozyajstva i okeanografii" (FGBNU "VNIRO")
(RU)C1
C 1
RU 2793471RU
2793471

C1

(54) METHOD FOR CULTIVATION OF CHAETOCEROS MUELLERI AND ISOCHRYYSIS GALBANA
UNICELLULAR MICROALGAE - LIVE FOOD FOR LARVAE OF MARINE INVERTEBRATES

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: cultivation is carried out in repeated technological cycles for an unlimited time. Each cycle lasting 32 days consists of two stages: the stage of growing the inoculum in closed cultivators in the accumulative mode and the stage of obtaining fodder biomass in open cultivators, first in the accumulative mode, then in the quasi-continuous mode of cultivation. The date of the beginning of each subsequent cycle of growing algae is shifted relative to the previous one by 8 days. The cultivation of microalgae at all stages is carried out in a pre-prepared nutrient medium F/2 based

on natural sea water, with round-the-clock illumination with a surface illumination of 14–16 klx, a temperature of 20–23°C, continuous bubbling of air through aquarium sprayers at a rate of 1.0–1.25 l/min per 1 liter of culture to maintain the pH of the medium in the range of 8.5–8.9.

EFFECT: invention makes it possible to ensure unlimited daily production of fodder biomass of Chaetoceros muelleri and Isochrysis galbana microalgae while maintaining their stable quality in all cycles.

1 cl, 2 ex

Изобретение относится к аквакультуре, в частности, к культивированию микроводорослей для использования в качестве живого корма при выращивании личинок морских беспозвоночных в искусственных условиях, в том числе в промышленных масштабах.

5 Микроводоросли являются единственным полноценным кормом при выращивании личинок морских беспозвоночных в искусственных условиях. На практике применяются накопительный и непрерывный (квазинепрерывный) режимы культивирования микроводорослей. Чаще всего для получения кормовой биомассы используют накопительный режим культивирования, который является наиболее разработанным
10 и изученным. Возможности проточной культуры, особенно в промышленных масштабах, реализованы слабо.

Известен способ культивирования диатомовой водоросли *Chaetoceros calcitrans* - корма для личинок гигантской устрицы *Crassostrea gigas*, предусматривающий накопительный режим культивирования в культиваторах закрытого типа (одноразовые
15 полиэтиленовые мешки V=20 л) в течение 11 суток при температуре 22-24°C, освещенности 10 клк, аэрации смесью воздуха и углекислого газа (2%), на модифицированной питательной среде 4F на основе стерильной морской воды.

Максимальная концентрация клеток в мешке на 11 сутки составляла $11,22 \times 10^6$ кл/мл
20 и 4,93 г/л сырой биомассы (патент №2663328, МПК A01K 61/00, опубл. 03.08.2018, Бюл. №22).

Недостатком данного способа является культивирование микроводорослей в накопительном режиме, при котором возможно периодическое, каждые 11 суток, получение кормовой биомассы, что неприемлемо при выращивании личинок и молоди (спата) беспозвоночных, когда требуется их ежесуточное, в течение более 25 суток
25 обеспечение живым кормом с постоянным биохимическим составом.

Известен способ культивирования *Chaetoceros calcitrans* в непрерывном режиме в культиваторах закрытого типа (одноразовые полиэтиленовые мешки диаметром 15 см и объемом 20-40 л) при скорости протока среды $1,0-1,3 \text{ сут}^{-1}$, на питательной среде F/2
30 при круглосуточном режиме освещения и освещенности белыми люминесцентными лампами 750-850 лк, температуре 20-23°C, аэрации ($0,9 \text{ л/мин}^{-1}$) смесью воздуха и углекислого газа (1%). Питательную среду готовили на основе пастеризованной природной морской воды соленостью 3,5%. Максимальная концентрация клеток
35 составляла $7-13 \times 10^6$ кл/мл. Для увеличения выхода кормовой биомассы увеличивали количество культиваторов до необходимого объема культуры. Указанный способ подтверждает возможность крупномасштабного получения (до 600 л суспензии) в непрерывном режиме кормовой биомассы для обеспечения живым кормом личинок и спата двустворчатых моллюсков («Continuous production of *Chaetoceros calcitrans* in a system suitable for commercial hatcheries», H.F. Kaspar, et al., J. Aquaculture, 420-421, 2014,
40 р. 1-9).

Недостатками предложенного способа являются нестабильность производственных характеристик культур микроводорослей, непредсказуемое снижение (до тысячекратных значений) концентрации клеток в культиваторах с последующим медленным восстановлением численности или полной гибелью культур, уменьшение плотности
45 клеток, сопровождаемое появлением взвешенных хлопьев в суспензии и/или «меха» на внутренней стенке культиватора и изменением биохимического состава получаемой кормой биомассы, вынужденная необходимость оперативного увеличения (до 30%) количества культиваторов для обеспечения кормом выращиваемых организмов.

Наиболее близким к заявляемому техническому решению и достигаемому результату является способ культивирования микроводоросли *Dunaliella salina* в полунепрерывном (квазинепрерывном) режиме в резервуарах открытого типа (контейнеры площадью 3 м²), при естественном освещении, на открытом воздухе, с использованием питательной среды на основе морской воды соленостью 12,5%, стерилизованную хлором, объеме суспензии 180-360 л с плотностью клеток 0,7-0,9×10⁶ кл/мл. Температура и освещенность в резервуарах не контролировалась, pH культуры поддерживали на уровне 7,5-8,0 путем добавления CO₂ со скоростью потока 0,2 л мин⁻¹. Каждые двое суток осуществляли отбор 50% выращенной суспензии и добавляли свежую питательную среду до первоначального объема культуры. При таком режиме культивирования средняя продуктивность биомассы составила 2,4*10¹⁰ клеток с 1 м² в сутки или 1,44 г сухого вещества («Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern Spain», M. García-González et al., J. Journal of Applied Phycology, 2003, p. 177-184).

Описываемый способ подтверждает возможность устойчивого непрерывного получения кормовой биомассы микроводорослей в крупномасштабных культиваторах открытого типа, в которых нет возможности создавать стерильные условия при культивировании микроводорослей. Заражение культуры другими микроорганизмами не фиксировалось в связи с тем, что увеличение солености морской воды при подготовке питательной среды до 12,5% (против океанической солености морской воды 3,5%) ограничивает развитие сопутствующей микробиоты. Однако предложенный режим культивирования невозможно применить при выращивании микроводорослей *Chaetoceros muelleri* и *Isochrysis galbana*, поскольку эти виды не произрастают в питательной среде с соленостью 12,5%.

Задачей заявленного изобретения является непрерывное получение кормовой биомассы культур микроводорослей *Chaetoceros muelleri* и *Isochrysis galbana* с постоянным биохимическим составом и продуктивностью для дальнейшего использования в качестве живого корма при выращивании личинок морских беспозвоночных в течение длительного времени.

Диатомовая водоросль *Chaetoceros muelleri* и Золотистая водоросль *Isochrysis galbana* являются оптимальным кормом при выращивании личинок морских беспозвоночных в искусственных условиях благодаря своим морфолого-биохимическим характеристикам. Их размеры, тонкий панцирь, единичность способствуют легкому заглатыванию и быстрому перевариванию личинками морских беспозвоночных. Питательная ценность микроводоросли обусловлена высоким содержанием белка до 38%; липидов до 15%; углеводов до 43% (по сухому веществу) для фазы замедления (или завершающей фазы экспоненциального роста) скорости роста численности клеток в культуре. Кормовая биомасса культуры микроводорослей *Chaetoceros muelleri* и *Isochrysis galbana* может быть использована в качестве живого корма для таких морских беспозвоночных, как например, дальневосточный трепанг, приморский гребешок, мидия и гигантская устрица.

Поставленная задача достигается тем, что микроводоросли *Chaetoceros muelleri* и *Isochrysis galbana* выращивают в нескольких технологических циклах длительностью, равной 32-м суткам, с их повторением в течение неограниченного времени. Каждый технологический цикл состоит из двух этапов: этапа выращивания инокулята в культиваторах закрытого типа в накопительном режиме (16 сут) и этапа получения кормовой биомассы в культиваторах открытого типа (16 сут), сначала в накопительном режиме (10 сут), затем в квазинепрерывном режиме культивирования (6 сут). Срок начала каждого последующего цикла выращивания водорослей смешен относительно

предыдущего на 8 суток.

Культивирование микроводорослей на всех этапах осуществляют в питательной среде F/2, приготовленной на основе очищенной природной морской воды, при круглосуточном освещении светодиодными лампами (4000К), создающими освещенность на поверхности культуры 14-16 клк, температуре 20-23°C, постоянной аэрации воздухом через аквариумный распылитель при скорости продувки 1,0-1,25 л/мин на 1 л культуры. Количество аэраторов для распыления атмосферного воздуха, содержащего 0,03% CO₂ с целью полного его растворения в культуре, определяют из расчета: один аэратор на 400-500 л культуры. При таких условиях аэрации не наблюдается застойных зон в культиваторах и pH среды не превышает 8,9 единиц.

Для приготовления питательной среды F/2 морскую воду подвергают комплексной очистке от растворенных и взвешенных органических веществ, в том числе, и планктона. Сначала морскую воду фильтруют, последовательно пропуская через фильтры с размерами пор 10; 5 и 1 мкм, и доводят ее температуру до 20-23°C. Затем воду хлорируют, избыточно насыщая активным хлором до концентрации 70-90 мг/л путем добавления в нее концентрата гипохлорита натрия, имеющего концентрацию активного хлора 120 г/л. Экспериментально определено, что время воздействия активного хлора на морскую воду не должно превышать 16-18 часов. За это время происходит полное окисление органической составляющей в морской воде. Превышение времени воздействия остаточного хлора приводит к изменению химизма морской воды, и она становится непригодной для выращивания микроводорослей. После полного окисления органической составляющей морскую воду дехлорируют, удаляя остаточный хлор путем внесения в нее пятиводного тиосульфата натрия, из расчета 200-250 мг/л, при активной аэрации воздухом в течение 2-3 часов. Концентрации активного хлора и тиосульфата натрия, которые необходимо создавать при обработке морской воды были определены экспериментально с учетом содержания органической составляющей в используемой природной морской воде.

В качестве культиваторов закрытого типа применяются 0,5; 1; 5-ти литровые стеклянные колбы и 30-ти литровые прозрачные пластиковые емкости, закрытые от контакта с атмосферой прозрачной пленкой. Культиваторы открытого типа представляют собой пластиковые ванны объемом 3 м³ с площадью поверхности 4 м².

При запуске первого цикла для выращивания инокулята используется суспензия водорослей из музеиных (коллекционных) культур. При втором и последующих циклах используется суспензия микроводорослей из инокулята предыдущего цикла. Минимальная начальная концентрация клеток, при которой культура начинает активно развиваться с минимальной лаг-фазой, составляет 0,4-0,5×10⁶ кл/мл.

Период культивирования микроводорослей в цикле ограничен по времени, поскольку технически невозможно поддерживать необходимую стерильность культуры при выращивании микроводорослей в крупномасштабных культиваторах открытого типа, т.к. в таких условиях обязательно происходит инфицирование культуры посторонними видами микроорганизмов (бактериями, простейшими или другими видами микроводорослей) и их массовое развитие неизбежно приводит к угнетению и гибели культуры. Массовое развитие сопутствующих видов в культуре наступает после 16-18 суток ее выращивания в культиваторах открытого типа.

Использование квазинепрерывного режима культивирования в технологическом цикле позволяет ежесуточно получать биомассу, которая является полноценным кормом для личинок морских беспозвоночных. При заданном режиме выращивания

концентрация клеток микроводорослей восстанавливается до первоначальной, что подтверждает стабильность биологической продуктивности и химического состава культуры микроводорослей.

После последнего отбора кормовой биомассы в любом из циклов выращивания

- 5 объем культуры не восполняется равноценным объемом свежей питательной среды, а используется в необходимом количестве для кормления личинок беспозвоночных до начала (1 сут) отбора кормовой биомассы из следующего цикла. Оставшаяся часть комовой биомассы в каждом цикле концентрируется центрифугированием и упаковывается под вакуумом в пакеты и сохраняется при температуре 2-3°C для
- 10 дальнейшего использования в качестве корма для молоди или взрослых особей беспозвоночных.

После завершения первого цикла выращивания освободившаяся ванна замывается, стерилизуется и используется в последующих циклах.

Технический результат достигается за счет культивирования микроводорослей в

- 15 многократно повторяющихся технологических циклах таким образом, что после завершения очередного цикла культивирования отбор выращенной биомассы начинают из следующего цикла, это обеспечивает неограниченное по времени ежесуточное получение кормовой биомассы с сохранением стабильного качества микроводорослей во всех циклах.

- 20 Способ осуществляют следующим образом.

Технологический цикл начинается с выращивания инокулята в культиваторах

закрытого типа в накопительном режиме в течение 16 суток. Для создания начальной концентрации клеток в культуре $0,4-0,5 \times 10^6$ кл/мл используется суспензия микроводорослей из музейной культуры или из инокулята предыдущего цикла

- 25 выращивания. По мере увеличения концентрации клеток до $1,5-1,7 \times 10^6$ кл/мл, при которой активно делящаяся культура находится на линейной стадии роста, осуществляют разведение культуры до начальной концентрации, путем добавления предварительно подготовленной свежей питательной среды F/2, при этом, объем
- 30 культиваторов, в которых выращивается культура, увеличивается. При достижении объема инокулята 100 л и концентрации клеток до $1,5-1,7 \times 10^6$ кл/мл, культуру перемещают в культиваторы открытого типа для выращивания кормовой биомассы, куда добавляют свежеприготовленную питательную среду до начальной концентрации клеток $0,4-0,5 \times 10^6$ кл/мл. Далее, в течение 10 суток, культивирование продолжают в

- 35 накопительном режиме без отбора выращенной биомассы. По мере увеличения концентрации клеток до $1,5-1,7 \times 10^6$ кл/мл, культуру разводят свежей питательной средой до начальной концентрации. При получении объема культуры в ванне 2200 л и концентрации клеток до $1,8-2,0 \times 10^6$ кл/мл, что соответствует фазе замедления (или

- 40 завершающей фазе экспоненциального роста) скорости роста численности клеток, культуру переводят в завершающий квазинепрерывный режим культивирования. В течение последующих 6 суток, периодически с интервалом в 24 ч, осуществляют отбор

- 45 20-25% суспензии микроводорослей и восполняют равноценным объемом свежеприготовленной питательной среды F/2. Культивирование микроводорослей на

- всех этапах проводят при круглосуточном освещении 14-16 клк и температуре 20-23°C. Культуру непрерывно барботируют воздухом через аквариумные распылители со скоростью продувки 1,0-1,25 л/мин на 1 л культуры, что обеспечивает поддержание pH среды в оптимальном диапазоне 8,5-8,9 единиц.

Выход кормовой биомассы *Chaetoceros muelleri* и *Isochrysis galbana* при квазинепрерывном культивировании складывается из ежедневных 20-25% отборов биомассы и биомассы, собираемой из культиваторов по окончании технологического цикла. Объем сливаемой суспензии составляет 440-550 л, число клеток в сливаемой суспензии - $(7,92-11) \times 10^{11}$ клеток.

Продуктивность по численности клеток микроводорослей составляет $(7,92-11) \times 10^{11}$ кл \times ванна $^{-1} \times$ сут $^{-1}$ или $(1,98-2,75) \times 10^{11}$ кл \times м $^{-2} \times$ сут $^{-1}$.

Продуктивность по сухому весу:

для *Chaetoceros calcitrans* при сухом весе (с.в.) 1-ой клетки 85×10^{-12} г составляет (67,5-93,5) г с.в. \times ванна $^{-1} \times$ сут $^{-1}$ или (16,8-23,3) г с.в. \times м $^{-2} \times$ сут $^{-1}$;

для *Isochrysis galbana* при сухом весе (с.в.) 1-ой клетки 19×10^{-12} г составляет (15-20,9) г с.в. \times ванна $^{-1} \times$ сут $^{-1}$ или (3,75-5,22 г с.в. \times м $^{-2} \times$ сут $^{-1}$.

Изобретение подтверждается следующими примерами:

Пример 1

Первый технологический цикл выращивания микроводорослей *Chaetoceros muelleri* и *Isochrysis galbana*.

Запуск первого технологического цикла начинали с выращивания инокулята из музеиных (коллекционных) культур в накопительном режиме в стеклянных колбах объемом 0,5; 1; 5 и 30-и литровых прозрачных пластиковых емкостях, закрытых от контакта с атмосферой прозрачной пленкой. Для сокращения времени получения необходимого объема инокулята выращивание осуществляли параллельно в четырех культиваторах. Предварительно для культивирования микроводорослей готовили свежую питательную среду из морской воды, которую сначала фильтровали, последовательно пропуская через фильтры с размерами пор 10; 5 и 1 мкм и доводили до температуры 20-23°C. Затем хлорировали, насыщая активным хлором до концентрации 80 мг/л путем добавления в нее концентрата гипохлорита натрия (с концентрацией активного хлора 120 г/л) из расчета 0,67 мл гипохлорита натрия на 1 л морской воды. Через 18 часов воду дехлорировали, внося в нее пятиводный тиосульфат натрия из расчета 200 мг/л, при активной аэрации воздухом в течение 3 часов.

Для адаптации музеиных культур микроводорослей к условиям культивирования использовали уровень освещенности 5 клк, который через 7 суток увеличивали до 16 клк. Начальная концентрация клеток и объем культуры составляла $0,45 \times 10^6$ кл/мл и 0,1 л суспензии соответственно. По мере увеличения концентрации клеток до $1,7 \times 10^6$ кл/мл, проводили разведение культуры свежей питательной средой до начальной концентрации, при этом объем выращиваемого инокулята увеличивался и суспензию микроводорослей последовательно перемещали из 0,5-литровых колб в 1-литровые, а далее в 5-литровые колбы. Когда объем суспензии в 5-ти литровых колбах достигал 4,5 л при концентрации клеток $1,7 \times 10^6$ кл/мл, 4,0 литра суспензии переносили в 30-ти литровые емкости и разводили свежей питательной средой до концентрации клеток $0,45 \times 10^6$ кл/мл.

Оставшийся объем 0,5 л использовали при выращивании инокулята в следующем технологическом цикле.

При достижении объема инокулята в четырех 30-ти литровых емкостях до 100 л с концентрацией клеток $1,7 \times 10^6$ кл/мл суспензию микроводорослей переносили в полном

объеме в открытую пластиковую ванну объемом 3 м³ с площадью поверхности 4 м², разбавили свежей питательной средой до начальной концентрации клеток 0,45×10⁶ кл/мл и продолжали выращивание кормовой биомассы в накопительном режиме в течение

5 10 суток. При мере увеличения концентрации клеток в культуре до 1,7×10⁶ кл/мл в ванну добавляли свежую питательную среду, разбавляя до начальной концентрации. При

10 достижении объема культуры до 2200 л и концентрации клеток 2,0×10⁶ кл/мл, культуру переводили в квазинепрерывный режим культивирования. В течение последующих 6 суток, периодически с интервалом в 24 ч, осуществляли отбор 25% суспензии

15 микроводорослей и восполняли равнозенным объемом свежей питательной среды. На всех этапах культивирования микроводоросли выращивали при температуре 23°C, постоянной аэрации воздухом через аквариумные распылители при скорости продувки 1,25 л/мин. на 1 л культуры, из расчета: один аэратор на 400-500 л культуры, и pH 8,6.

Объем ежедневно сливающейся суспензии клеток и их количество составили 550 л и

15 11×10¹¹ клеток соответственно.

Продуктивность по клеткам микроводорослей составила 11×10¹¹ кл × ванна⁻¹ × сут⁻¹ или 2,75×10¹¹ кл × м⁻² × сут⁻¹.

Продуктивность по сухому весу:

20 для *Chaetoceros calcitrans* при сухом весе (с.в.) 1-ой клетки 85×10⁻¹² г составила 93,5 г с.в. × ванна⁻¹ × сут⁻¹ или 23,3 г с.в. × м⁻² × сут⁻¹;

25 для *Isochrysis galbana* при сухом весе (с.в.) 1-ой клетки 19×10⁻¹² г составила 20,9 г с.в. × ванна⁻¹ × сут⁻¹ или 5,22 г с.в. × м⁻² × сут⁻¹.

После завершения первого цикла выращивания освободившаяся ванна замывалась, стерилизовалась и использовалась в последующих циклах.

Пример 2

Второй технологический цикл выращивания микроводорослей *Chaetoceros muelleri* и *Isochrysis galbana*.

30 Для выращивания инокулята использовали 5-ти литровые стеклянные колбы и 30-и литровые прозрачные пластиковые емкости. Для создания начальной концентрации клеток 0,45×10⁶ кл/мл в культуре использовали суспензию микроводорослей (0,5 л) из

35 5-ти литровых колб первого цикла с концентрацией клеток 1,7×10⁶ кл/мл, которую помещали в четыре 5-ти литровые колбы. Дальнейшее выращивание микроводорослей осуществляли так же, как и в первом технологическом цикле. При достижении объема

культуры до 2200 л и концентрации клеток 2,0×10⁶ кл/мл, культуру переводили в квазинепрерывный режим культивирования. В течение последующих 6 суток,

40 периодически с интервалом в 24 ч, осуществляли отбор 20% суспензии микроводорослей и восполняли равнозенным объемом свежей питательной среды

Объем ежедневно сливающейся суспензии клеток и их количество составили 500 л и 10×10¹¹ клеток соответственно.

45 Продуктивность по клеткам микроводорослей составила 10×10¹¹ кл × ванна⁻¹ × сут⁻¹ или 2,5×10¹¹ кл × м⁻² × сут⁻¹.

Продуктивность по сухому весу:

для *Chaetoceros calcitrans* при сухом весе (с.в.) 1-ой клетки 85×10⁻¹² г составила 85 г

с.в. × ванна⁻¹ × сут⁻¹ или 21,25 г с.в. × м⁻² × сут⁻¹;

для Isochrysis galbana при сухом весе (с.в.) 1-ой клетки 19×10^{-12} г составила 19 г с.в. × ванна⁻¹ × сут⁻¹ или 4,75 г с.в. × м⁻² × сут⁻¹.

5

(57) Формула изобретения

Способ культивирования одноклеточных микроводорослей Chaetoceros muelleri и

Isochrysis galbana - живого корма для личинок морских беспозвоночных,

характеризующийся тем, что культивирование осуществляют в многократно

10 повторяющихся технологических циклах в течение неограниченного времени, срок начала каждого последующего цикла смешен относительно предыдущего на 8 суток и после завершения очередного цикла культивирования отбор выращенной биомассы начинают из следующего цикла, способ включает выращивание инокулята в

культиваторах закрытого типа в накопительном режиме в течение 16 суток,

15 выращивание кормовой биомассы в культуvаторах открытого типа, сначала в накопительном режиме в течение 10 суток, затем в квазинепрерывном режиме в течение 6 суток при удельной скорости протока среды 0,2-0,25 сут⁻¹, культивирование проводят при круглосуточном освещении с поверхностной освещенностью 14-16 клк, температуре 20-23°C, непрерывном барботировании воздухом через аквариумные распылители со

20 скоростью 1,0-1,25 л/мин на 1 л культуры для поддержания pH среды в диапазоне 8,5-8,9, в подготовленной питательной среде F/2 на основе натуральной морской воды, которую предварительно фильтруют, хлорируют в течение 16-18 часов, насыщая активным хлором до концентрации 70-80 мг/л путем добавления в нее концентрата гипохлорита натрия, имеющего свою концентрацию активного хлора 120 г/л, затем

25 дехлорируют раствором пятиводного тиосульфата натрия с концентрацией 200-250 мг/л в течение 2-3 часов при продувке воздухом.

30

35

40

45