

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ BRACHIONUS PLICATILIS

Рожнова Виктория Олеговна

Ассистент, Керченский государственный морской
технологический университет
yaviktoria.troyan@yandex.ru

INVESTIGATION OF THE PECULIARITIES OF BRACHIONUS PLICATILIS CULTIVATION

V. Rozhnova

Summary. The article examines the patterns of reproductive dynamics and thermal stability of populations of marine rotifers *Brachionus plicatilis* when using various feed substrates under conditions of uncontrolled temperature fluctuations (20–23°C). A three-variant laboratory experiment compared a mono-diet of baking yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), a combination of *Diacronema lutheri* (11×10^6 cells/ml) with yeast and vitamin B₁₂ (0.02 ml/l), as well as an experimental mixture of *Diacronema lutheri* + Methionine + vitamin B₁₂. Cultivation was carried out in glass bioreactors (2000 ml, salinity 12–13 ‰, initial density 20 individuals/ml) with aeration and monitoring of temperature and population size. The significant superiority of enriched nutrient mixtures has been established. The results obtained substantiate the expediency of switching from a traditional yeast mono-diet to standardized combined substrates for the production of high-quality live feed in aquaculture. The developed approaches increase the reproductive capacity of rotifers, minimize the risks of developmental pathologies of larval marine fish (pigmentation deficiency, reduced immunogenicity) and ensure the survival of fry, creating the basis for sustainable technologies of mass cultivation.

Keywords: *Brachionus plicatilis*, *Diacronema lutheri*, reproductive dynamics, thermal stability, DC-PUFA omega-3, methionine, aquaculture, live feed.

Введение

Выращивание мальков рыб, особенно этап их кормления, является одним из наиболее сложных и критически важных в аквакультуре. Успех этого процесса определяет эффективность всего производства. Традиционно для кормления используют живые подвижные организмы, обеспечивающие оптимальный баланс нутриентов и стимуляцию пищеварительных процессов. Однако применение сухих кормов сопряжено с существенными трудностями: низкая ферментативная активность и недоразвитость желудочно-кишечного тракта мальков препятствуют их усвоению, что приводит к дефициту нутриентов, замедлению роста мальков и нарушению развития.

Поэтому одной из ключевых задач, стоящих перед специалистами в области аквакультуры, является по-

Аннотация. В статье исследованы закономерности репродуктивной динамики и термостойкости популяций морских коловраток *Brachionus plicatilis* при использовании различных кормовых субстратов в условиях неконтролируемых температурных колебаний (20–23°C). В трехвариантном лабораторном эксперименте сравнивались монодиета хлебопекарных дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*), комбинация диакронемы лютера (*Diacronema lutheri*, 11×10^6 кл./мл) с дрожжами и витамином B₁₂ (0,02 мл/л), а также экспериментальная смесь *диакронемы лютера* (*Diacronema lutheri*) + метионин + витамин B₁₂. Культивирование проводилось в стеклянных биореакторах (2000 мл, соленость 12–13 ‰, исходная плотность 20 особей/мл) с аэрацией и мониторингом температуры и численности популяций. Установлено значительное превосходство обогащенных питательных смесей. Полученные результаты обосновывают целесообразность перехода от традиционной дрожжевой монодиеты к стандартизированным комбинированным субстратам для производства высококачественного живого корма в аквакультуре. Разработанные подходы повышают репродуктивную емкость ротиферов, минимизируют риски патологий развития личиночных морских рыб (дефицит пигментации, сниженная иммуногенность) и обеспечивают выживаемость мальков, создавая основу для устойчивых технологий массового культивирования.

Ключевые слова: *Brachionus plicatilis*, *Diacronema lutheri*, репродуктивная динамика, термостойкость, ДЦ-ПУЖК омега-3, метионин, аквакультура, живой корм.

вышение доступности живых кормов для мальков рыб. Данная проблема предполагает разработку инновационных кормовых смесей, обладающих повышенной усвояемостью и минимизирующих антропогенное воздействие на аквакультурную среду. Необходимо подчеркнуть, что до появления эффективных искусственных заменителей, обеспечивающих полноценное замещение биологически активных компонентов живых кормов, фитопланктон и зоопланктон сохраняют статус приоритетных источников питания на ранних стадиях постэмбрионального развития. Таким образом, проблема кормления мальков выходит за рамки чисто технологических решений и представляет собой комплексную научную задачу, решение которой требует глубокого понимания физиологических и биохимических процессов, протекающих в организме рыб на стадии личиночного развития.

Исследования в области кормления мальков продолжают и ориентированы на разработку инновационных технологий, повышающих эффективность культивирования и минимизирующих экологическое воздействие. При этом морские коловратки *Brachionus plicatilis* [1, 8] (далее — *B. plicatilis*) продолжают оставаться не только одним из наиболее распространенных объектов живого корма в аквакультуре, выполняя ключевую функцию в трофических цепях морских экосистем и производственных системах, но и выступают основным объектом научного исследования в области культивирования в целях кормления мальков.

Несмотря на теоретическую возможность культивирования популяций *B. plicatilis* с повышенной нутриентной ценностью, на практике получаемые культуры часто демонстрируют сниженные биологические показатели. Это обусловлено комплексом факторов, включая недостаточный уровень гигиенических стандартов и деградацию физиологического состояния культуры, что проявляется в уменьшении скорости локомоции и репродуктивной активности. К основным ограничениям массового производства *B. plicatilis* относятся непредсказуемость накопления биомассы, трудности регуляции и сбора высокоплотных популяций, а также сложности получения аксиальных культур без контаминации патогенными микроорганизмами и загрязнителями.

Указанные факторы существенно снижают продуктивность и биобезопасность производства. Зоотехнические аспекты культивирования остаются недостаточно изученными, особенно в части селекции: отбор клонов осуществляется без применения генетических методов, что приводит к неоптимальному использованию генетического потенциала и ограничивает улучшение репродуктивных и нутриентных характеристик, что, как следствие, сказывается на эффективности аквакультурных систем в целом.

Учитывая вышесказанное, видится необходимым выработка комплексного подхода к решению обозначенных проблем, включающего экономическую эффективность разведения *B. plicatilis*, а также внедрение современных методов селекции и биотехнологий мониторинга, что позволит повысить репродуктивную емкость, нутриентный профиль и стабильность производства *B. plicatilis*.

Экономическая целесообразность интенсивного культивирования *B. plicatilis* определяется доступностью экономически выгодных кормовых субстратов, что обусловило преобладание хлебопекарных дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) в составе питательных сред. Эти дрожжи обеспечивают высокие темпы репродукции популяций при минимальных затратах на подготовку и стерилизацию культурной среды.

В системах крупномасштабного культивирования дрожжи применяются преимущественно в нестерильных условиях, где питание *B. plicatilis* обеспечивается нативными бактериальными и дрожжевыми популяциями, развивающимися в ходе субстратной ферментации [1]. Данный режим позволяет достигать высоких плотностей культуры (300–500 особей/мл) при минимальных технологических затратах, определяя его приоритетность для коммерческих аквакультурных производств.

Однако фундаментальным ограничением дрожжевого рациона является дефицит длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот (далее — ДЦ-ПУЖК) семейства омега-3, в частности эйкозапентаеновой (далее — ЭПК, 20:5n-3) и докозагексаеновой (далее — ДГК, 22:6n-3) кислот, необходимых для нормального роста, морфогенеза и выживаемости личиночных стадий многих морских рыб [2, 6, 8, 10]. Накопление ДЦ-ПУЖК семейства омега-3 в липидах *B. plicatilis* определяет их нутриентную ценность как корма для мальков: дефицит вызывает патологии пигментации («красная болезнь»), снижение стрессоустойчивости и повышенную летальность при переходе к экзогенному питанию.

При наличии достаточного количества высококачественных микроводорослей (изохрисис галбана (далее — *Isochrysis galbana*), наннохлорепсис глазчатый (далее — *Nannochloropsis oculata*), родомонас солоноватый (далее — *Rhodomonas salina*)) они служат оптимальным источником ДЦ-ПУЖК семейства омега-3 для *B. plicatilis* [5, 7, 9]. Высокие концентрации ЭПК, 20:5n-3 в *Nannochloropsis oculata* и ДГК, 22:6n-3 в *Isochrysis galbana* и *Rhodomonas salina*, в сочетании с относительной простотой их культивирования, определяют их ценность как кормовых субстратов в аквакультуре [3, 4].

Инкубация *B. plicatilis* в культурах микроводорослей (плотность 5—25 × 10⁶ кл./мл) обеспечивает быстрое накопление ДЦ-ПУЖК семейства омега-3 в течение 4–6 часов, с формированием специфического липидного профиля, определяемого видом субстрата. При использовании *Isochrysis galbana* соотношение ЭПК, 20:5n-3/ДГК, 22:6n-3 превышает 2, что оптимально для личиночного кормления многих морских рыб. В отличие от него, тетрасельмис (*Tetraselmis*) характеризуется преобладанием ЭПК, 20:5n-3 над ДГК, 22:6n-3 (соотношение <0,5), обусловленным высоким содержанием ЭПК, 20:5n-3 в его хлоропластных липидах и низкой долей ДГК, 22:6n-3, что делает его предпочтительным для обогащения *B. plicatilis* на ранних стадиях личиночного цикла рыб с повышенными требованиями к ЭПК, 20:5n-3.

Тем не менее, высококачественные микроводоросли в большинстве случаев недоступны в необходимых объемах из-за высокой стоимости производства и обогащения [7]. Поэтому *B. plicatilis* перед кормлением личи-

ночных рыб обогащают липидными эмульсиями с последующей выдержкой в чистой воде или «зеленой воде».

«Зеленая вода» представляет собой суспензию микроводорослей ($0,2 \times 10^6$ кл./мл *Tetraselmis*, *Nannochloropsis* или *Isochrysis spp.*), поддерживающую оптимальный уровень ДЦ-ПУЖК семейства омега-3 в липидах коловраток [9, 10]. Стабильные водорослевые продукты в форме концентрированных паст и замороженной биомассы (*Tetraselmis*, *Nannochloropsis*, *Isochrysis galbana*), как отмечают в специализированной литературе, представляют собой инновационные кормовые субстраты, сохраняющие жизнеспособность и нутриентный профиль в течение длительного времени [9]. Согласно научным исследованиям, их ключевые преимущества включают возможность транспортировки и хранения паст при + 4°C до 2 недель без потери качества, исключение необходимости локального культивирования микроводорослей, гарантированный высокий уровень ДЦ-ПУЖК омега-3 при отсутствии контаминации, стандартизированный химический состав липидов (ЭПК, 20:5n-3/ ДГК, 22:6n-3) и достижение высоких плотностей культуры *B. plicatilis* (до 500 особей/мл) при использовании концентрированных субстратов [9]. Эти свойства определяют стабильные продукты как экономически и технологически предпочтительную альтернативу живым культурам микроводорослей.

Методология исследования

Для изучения влияния различных кормовых субстратов на репродуктивную динамику и накопление ДЦ-ПУЖК семейства омега-3 в *B. plicatilis* применялись следующие методы: культивирование в трехвариантном эксперименте (контроль на хлебопекарных дрожжах, комбинация генетически близкородственные микроводоросли *Isochrysis galbana* и водоросли диакронема Лютери ((далее — *Diacronema lutheri*) с дрожжами и витамином В₁₂, (экспериментальная смесь *Diacronema lutheri* + метионин + витамин В₁₂) в стеклянных биореакторах (2000 мл, соленость 12–13 ‰, аэрация); мониторинг плотности популяции (исходно 20 особей/мл) и температуры окружающей среды; статистическая обработка данных в Microsoft Excel 2007. Совокупность указанных методов позволила количественно оценить эффективность кормовых добавок, выявить оптимальные условия культивирования и установить зависимость репродуктивных показателей от нутриентного состава субстрата.

Результаты и обсуждение

Для подтверждения гипотезы о превосходстве комбинированных кормовых субстратов на основе *Diacronema lutheri* над монодиетой хлебопекарных дрожжей в культивировании *B. plicatilis* в лабораторных условиях был

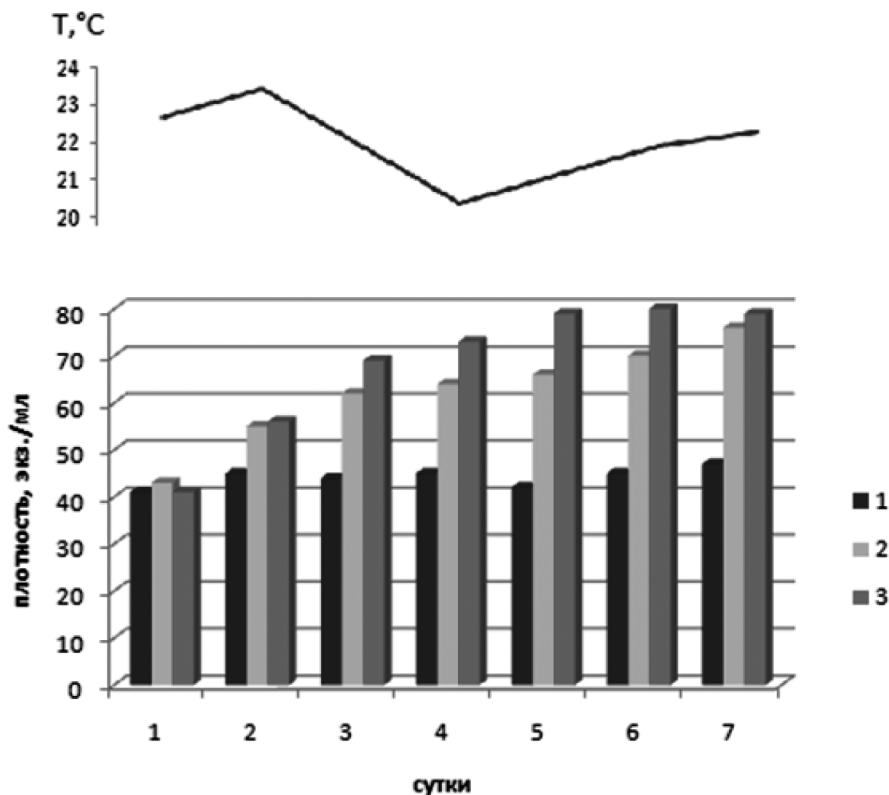


Рис. 1. Изменение плотности культур коловратки в зависимости от состава питательных смесей:
 1 — *Saccharomyces cerevisiae*, 2 — водоросль *Diacronema lutheri* + дрожжи+ витамин В₁₂,
 3 — водоросль *Diacronema lutheri* + метионин + витамин В₁₂)

проведен эксперимент. Температура в культурах варьировалась в пределах 20–23°C (рис. 1), с лаг-фазой длительностью 24 часа при 23°C и последующим переходом к экспоненциальной фазе роста. Снижение температуры на 4-й день вызвало уменьшение плотности популяции во всех вариантах, однако в экспериментальной группе 3 (*Diacronema lutheri* + метионин + витамин B₁₂) прирост численности оставался максимально выраженным, подтверждая эффективность предложенной кормовой добавки (рис. 2).

Полученные данные экспериментально обосновывают целесообразность применения метионина и витамина B₁₂ для оптимизации репродуктивной динамики *B. plicatilis* в контролируемых лабораторных условиях.

Поскольку температурные колебания существенно влияли на динамику роста популяций *B. plicatilis* во всех экспериментальных группах (рис.2), это обусловило необходимость проведения сравнительного анализа репродуктивных показателей в зависимости от состава кормового субстрата.

В контрольной группе, получавшей монодиету хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, зафиксирована высокая чувствительность к температурному стрессу: на 4-й день культивирования снижение температуры с 23°C до 20°C привело к отрицательному приросту численности популяции (снижение на 25–30 % от максимального значения) с последующим частичным восстановлением при естественном повышении температуры. Данная динамика свидетельствует о выраженной температурной зависимости репродуктивных процессов при дефиците ДЦ-ПУЖК семейства омега-3 в рационе.

Варианты 2 (*Diacronema lutheri* + дрожжи + витамин B₁₂) и 3 (*Diacronema lutheri* + метионин + витамин B₁₂) характеризовались существенно большей термоустойчивостью: снижение плотности популяции составило менее 10%, а экспоненциальная фаза роста возобновилась быстрее (рис.2). В экспериментальной группе 3 прирост численности оставался максимально выраженным даже при неблагоприятных температурных условиях.

Полученные экспериментальные данные подтверждают повышенную чувствительность *B. plicatilis*, культиви-

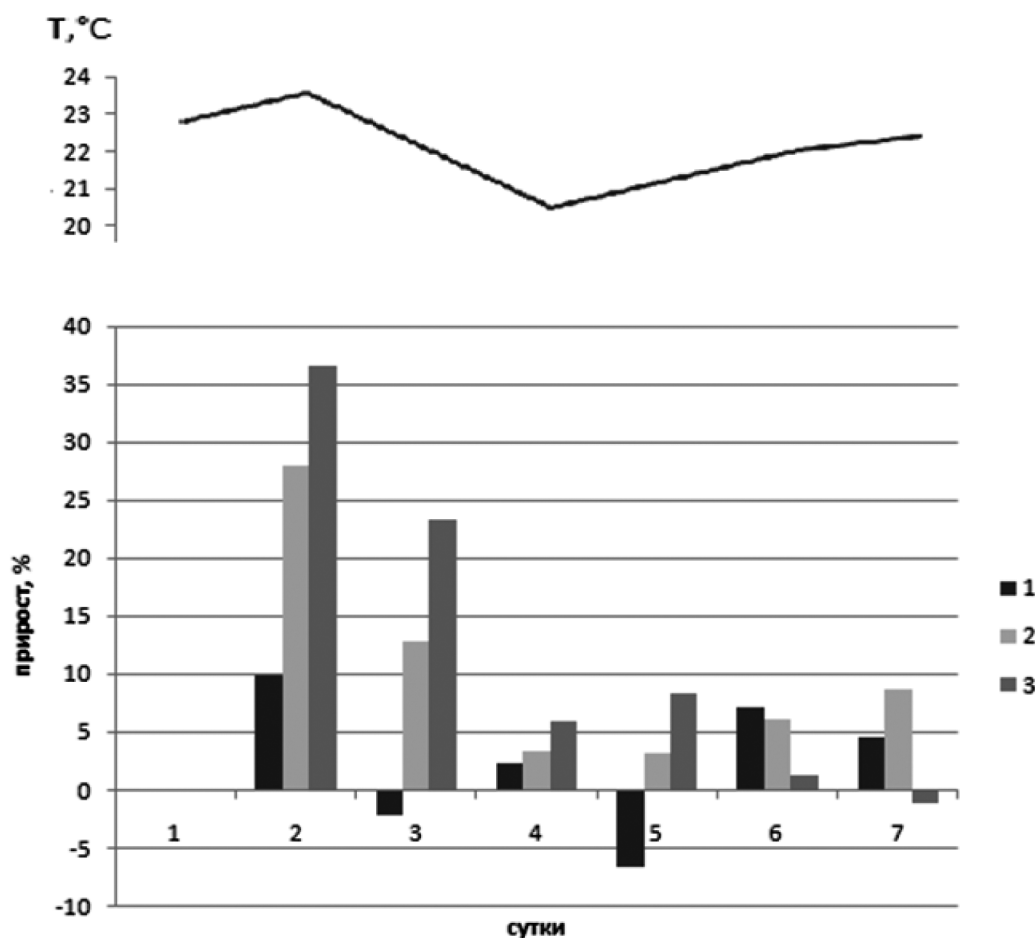


Рис. 2. Приросты плотности культуры коловратки в зависимости от состава питательных смесей:

1 — дрожжи, 2 — водоросль *Diacronema lutheri* + дрожжи + витамин B₁₂,

3 — водоросль *Diacronema lutheri* + метионин + витамин B₁₂

вируемой на дрожжевой монодиете, к температурным колебаниям окружающей среды, с пропорциональным снижением темпов роста и репродуктивной активности. В противоположность этому, использование кормовых смесей, обогащенных микроводорослями как источником ДЦ-ПУЖК семейства омега-3, обеспечивало повышенную физиологическую устойчивость, стабильность численности популяции и сокращение лаг-фазы восстановления при стрессовых воздействиях.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о значительно более высокой репродуктивной динамике популяций *B. plicatilis* при использовании питательных смесей на основе *Diacronema lutheri* с добавлением метионина и витамина B₁₂ по сравнению с монодиетой хлебопекарных дрожжей. В контрольной группе на дрожжах наблюдалась отрицательная динамика численности при температурном стрессе (снижение на 25–30 %), тогда как в экспериментальной группе 3 прирост плотности популяции оставался стабильным даже при неблагоприятных условиях (снижение <10 %), что подтверждает гипотезу о превосходстве обогащенных кормовых субстратов.

Данный результат представляет фундаментальное значение для оптимизации технологий массового производства живого корма в аквакультуре, поскольку *B. plicatilis* служит ключевым звеном в питании личиночных стадий морских рыб, требующих источников ДЦ-ПУЖК семейства омега-3 (ЭПК, 20:5n-3/ ДГК, 22:6n-3) для нормального морфогенеза, пигментации и иммуногенеза.

Применение питательных смесей позволяет не только повысить репродуктивную емкость *B. plicatilis* (до 500 особей/мл), но и обеспечить их обогащение незаменимыми липидами, минимизируя риски патологий («красная болезнь») у потребителей.

В условиях неконтролируемой температуры окружающей среды (20–23°C), характерных для полевых аквакультурных производств, рекомендуется переход от дрожжевой монодиеты к комбинированным субстратам с высоким содержанием микроводорослей и аминокислотных добавок. Полученные выводы создают основу для разработки стандартизированных протоколов культивирования и требуют дальнейших исследований по селекции высокопродуктивных клонов *B. plicatilis*, оптимизации доз метионина и оценке долгосрочных эффектов на выживаемость личиночных рыб.

Полученные выводы имеют фундаментальное значение для аквакультурной науки и практики, поскольку разработка стандартизированных протоколов культивирования *B. plicatilis* решит ключевую проблему обеспечения стабильных поставок высококачественного живого корма, обогащенного оптимальным соотношением

длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот (ДЦ-ПУЖК) семейства омега-3 (ЭПК, 20:5n-3/ДГК, 22:6n-3 >1–2), что минимизирует критические патологии развития личиночных рыб, включая дефицит пигментации («красная болезнь»), сниженную иммуногенность, нарушения морфогенеза нервной системы и повышенную восприимчивость к патогенам, повышая в итоге выживаемость мальков на 20–40 % и коэффициент конверсии корма на 15–25 %, что особенно критично для коммерческой аквакультуры морских видов (*Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax*, *Puntazzo puntazzo*).

Селекция высокопродуктивных клонов устраним существующее отсутствие генетически обоснованных методов отбора (RAPD-маркеры, AFLP-анализ, митохондриальная ДНК), ограничивающее репродуктивную емкость популяций максимумом 300–500 особей/мл и высокой вариабельностью клональных линий, и позволит увеличить продуктивность в 1,5–2 раза за счет отбора по критериям репродуктивного индекса (кист/самка/сутки >25), скорости локомоции и термостабильности, эквивалентно экономии миллионов рублей на гектар аквакультурных площадей и снижению зависимости от импортных стартовых культур.

Оптимизация доз метионина как лимитирующей серосодержащей аминокислоты (предположительно 0,5–2 мг/л) обеспечит переход от эмпирических практик к технологиям с высокой воспроизводимостью результатов между лабораториями, включая дозозависимые эффекты на синтез метаболитов (S-аденозилметионин) и репродуктивную сигнализацию. Долгосрочная оценка трансферных эффектов ДЦ-ПУЖК через цепочку «корм — ротифер — личиночная рыба» на выживаемость при отлучении от живого корма (*weaning*), скорости роста мальков (*juvenile growth rate*) и коэффициента конверсии корма (*FCR, feed conversion ratio*) при температурах 18–25°C закроет фундаментальный пробел в знаниях о липидном метаболизме личиночных стадий, создав полные данные для конкретных видов и замкнутую систему «генетика × корм × среда — продуктивность корма — рост рыбы», повышающую коэффициент конверсии корма на 30–50 %, снижающую себестоимость на 20–35 % и делающую производство полностью независимым от природных популяций планктона, сезонных колебаний и логистических рисков поставок микроводорослей.

Заключение

Подводя итог, необходимо отметить, что нестабильность результатов при разведении личиночных стадий морских рыб в значительной степени обусловлена вариабельностью физиологического состояния и нутриентной ценности партий живого корма *B. plicatilis*. Данная изменчивость представляет собой имманентное свой-

ство динамики ротицерных популяций и не поддается полному устранению в условиях массового производства.

Полученные экспериментальные данные демонстрируют принципиальную возможность минимизации указанных рисков за счет перехода от традиционных периодических культур на хлебопекарных дрожжах к стандартизированным питательным смесям на основе *Diacronema lutheri* с добавлением метионина и витамина B₁₂, обеспечивающим повышенную термоустойчивость, репродуктивную емкость (до 500 особей/мл) и оптимальное соотношение ДЦ-ПУЖК семейства омега-3 (ЭПК, 20:5n-3/ ДГК, 22:6n-3 > 1–2).

Разработанные подходы создают основу для внедрения устойчивых технологий культивирования, ориенти-

рованных на строгий контроль параметров среды (соленость 12–13 ‰, аэрация, температура 20–23°C), качества водной среды и микробиоты, а также использование высококачественных кормовых добавок. Перспективы дальнейших исследований включают генетическую селекцию продуктивных клонов *B. plicatilis*, оптимизацию доз лимитирующих аминокислот и долгосрочную оценку трансферных эффектов на выживаемость личиночных рыб при отлучении от живого корма, скорость роста мальков и коэффициент конверсии корма.

Реализация данных технологий позволит обеспечить стабильное производство обогащенного живого корма, повысить выживаемость личиночных рыб, снизить себестоимость аквакультурного производства на и минимизировать экологическое воздействие, формируя основу современной аквакультуры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аронович Т.М., Спекторова Л.В. 1973. Некоторые данные по питанию личинок камбалы калкана *Scophthalmus vaeoticus* в лабораторных условиях // Труды ВНИРО. Т. 94. С. 34–43.
2. Бакаева Е.Н. Эффективность роста коловраток в условиях аквакультуры. Автореф. дис... канд.биол.наук. Минск: Институт зоологии АН Беларуси, 1992. 20 с.
3. Бурлаченко И.С. Зарубежный опыт развития прибрежной, морской и океанической марикультуры и ее приоритетные задачи в Российской Федерации // Рыбоводство и рыбное хозяйство. 2008. № 1. С. 52–56.
4. Винберг Г.Г. Интенсивность обмена и пищевые потребности рыб. — Минск: Изд-во БГУ, 1956. 247 с.
5. Воронова Н.С. Исследование состава льняного жмыха как нового ингредиента в производстве молочных продуктов / Н.С. Воронова, Л.С. Бередица // Современные тенденции технических наук: материалы IV Междунар. науч. конф. (г. Казань, октябрь 2015 г.). Казань: Бук, 2015. С. 93–96.
6. Галковская Г.А., Головчиц В.А. Митянина И.Ф. Кн. «Эколого-биологические основы массового культивирования коловраток». Минск, 1988. 140 с.
7. Новоселова Н.В. К методике культивирования живых кормов для объектов морской аквакультуры // Современные рыбохозяйственные и экологические проблемы Азово-черноморского региона Материалы IX Международной научно-практической конференции. 2017 Издательство: Керченский филиал («ЮгНИРО») федерального государственного бюджетного научного учреждения «Азовский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства» (Керчь). С.144–162.
8. Спекторова Л.В. Инструкция по массовому разведению морских одноклеточных водорослей и коловраток / Л.В. Спекторова, С.Л. Паньков, Е.С. Проскурина, С.В. Шершов, А.М. Семик. М.: ОНТИ ВНИРО, 1986. 64 с.
9. Hou Y., Wu G. (2017) Nutritionally nonessential amino acids: a misnomer in nutritional sciences. *Advances in Nutrition*, 8(1): 137–139.
10. Watanabe T. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review / T. Watanabe, T. Kitajima, S. Fugita // *Aquacultura*. — v. 34 — № 1-2. — 1983. — P.115–143.

© Рожнова Виктория Олеговна (yaviktoria.troyan@yandex.ru)
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»