

Передбачуваний винахід відноситься до морської аквакультури і може бути використаний для проведення експериментальних робіт з морської біології, фізіології і біохімії і біологічного тестування в галузі морської токсикології, а також як живі корми при вирощуванні личинок цінних морських риб.

Каланоїдні копеподи є важливим компонентом морського харчового ланцюга і найбільш повноцінним живим кормом як для личинкових, так і дорослих стадій морських риб. Тому розробка способу їхнього культивування з метою одержання масової кількості однорідних організмів, вирощених у заданих умовах середовища, що характеризуються однорідним віковим і біохімічним складом, важлива як для проведення достовірних експериментальних робіт в галузі морської біології, екології, фізіології, біохімії, біологічного тестування, так і для розробки методів вирощування повноцінної здорової молоді цінних порід морських риб (наприклад, камбали калкана).

Дотепер не розроблений жоден спосіб масового культивування чорноморських каланоїдних копепод *Calanus euxinus* з яйця до статевозрілого організму.

Відомий спосіб вирощування близькосторідного атлантичного виду каланоїдних копепод *Calanus helgolandicus* [див. Paffenhofer G.-A. Cultivation of *Calanus helgolandicus* under controlled conditions // Helg. wiss. Meeresunters. - 1970. - 20. - P. 346-359]. Спосіб передбачає вилов із природних акваторій диких самок калянуса й одноразове одержання від них яєць при температурі 15°C. Для годівлі наупліїв калянуса у 1-2 л циліндри вносять морські міководорості - діатомові *Lauderia borealis*, *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros curvicensis*, і дінофлагелляти *Gymnodinium splendens*. Для скорочення часу досягнення статевої зрілості від яйця рекомендується підтримувати концентрації міководоростей близько 100 мкг С/л. Щільність калянусов від викльовування з яйця до копеподита С1 знижують від 0,33 до 0,023 екз/мл.

Відомий спосіб має ряд істотних недоліків.

Основними недоліком є неможливість попередньої оцінки кількості і якості одержуваного матеріалу - наупліїв калянусів з яєць, отриманих від самок калянусів, що розвивалися в природних умовах. По-перше, кількість яєць, які продукуються цими самками калянуса непередбачена, тому що залежить від кількості і якості їхнього живлення в зовнішньому середовищі. По-друге, при використанні відомого способу непередбачений відсоток життєздатних яєць, і, отже, відсоток життєздатних наупліїв, тому що харчування самок у природних умовах неконтрольоване, а з літературних і власних експериментальних даних відомо, що навіть при високій продуктивності яєць, відсоток життєздатних наупліїв калянуса залежить від якісного складу їжі самок. По-третє, при одержанні яєць від самок не проводиться дезинфекція яєць і, таким чином, із зовнішнього середовища переносяться патогенні мікроорганізми, що впливають як на виживання самих калянусів, так і, при використанні їх як живі корми, на виживання личинок риб.

В основу «Способу культивування каланоїдних копепод *Calanus euxinus* (чорноморського калянуса)» поставлена задача шляхом розробки нової технології культивування забезпечити одержання синхронної масової популяції калянуса, що складається з особин однорідного вікового, розмірного і біохімічного складу за визначений термін.

Поставлена задача досягається тим, що виловлених самок витримують у дезинфекційному розчині при температурі 15°C протягом 1,5 години з додаванням міководоростей *Euxiaella cordata*, після чого здійснюють процедуру підготовки для синхронізації масового одержання яєць, з яких одержують синхронну масу яєць, стимулюють синхронне викльовування наупліїв і одержують синхронні вікові когорти калянуса.

Синхронна культура необхідна для одержання масової кількості калянусів (наупліальних чи копеподітних стадій) заданого віку (розміру, біохімічного складу). Протягом життєвого циклу калянус проходить 6 наупліальних (личинкових, що позначаються N1-N6), 5 - копеподітних стадій (C1-C5) і одну, останню, 12 життєву стадію - дорослий калянус (самка чи самець, що позначається C6♀ чи C6♂). Перехід від однієї стадії до іншої здійснюється в результаті морфологічних змін, наростання маси, розмірів тіла і зміни покривів (линяння). Після переходу у стадію C6, калянус досягає термінальних розмірів тіла і більше не линяє. Надалі може відбуватися тільки приріст біомаси калянуса, наприклад, за рахунок відкладення запасних речовин і формування генеративної маси. Терміни досягнення (проходження чергового линяння) кожної наступної стадії калянуса обумовлені ендегенними (запрограмованими генетично) механізмами процесів і залежать від комплексу модифікуючих їх температурних і трофічних умов утримання організмів.

Спосіб реалізується таким чином.

- 1) Одержання самок калянуса.
- 2) Процедура підготовки самок калянуса до синхронізації масового одержання яєць.
- 3) Процедура одержання синхронної маси яєць калянуса.
- 4) Процедура синхронного викльовування наупліїв з яєць.
- 5) Одержання синхронних вікових когорт калянуса.

Приклад реалізації способу

Одержання самок калянуса

У листопаді 2003 р. тралили зоопланктонною мережею на глибинах від 40 до 0 м. Отримані зоопланктонні проби переносили в лабораторні приміщення. Статевозрілих самок калянуса відокремлювали від основної маси планктону і поміщали в дезинфікуючий розчин, приготовлений на основі морської води стандартної чорноморської солоності 17,5-18,5‰, стерилізованої шляхом механічної фільтрації (через ряд послідовних картриджних фільтрів з розміром вічок 10, 5, 1 мкм) і обробки ультрафіолетом. Самок при температурі 15°C витримували в дезинфекційному розчині з додаванням міководоростей *Euxiaella cordata* (syn. *Prorocentrum minimum*) протягом 1,5 годин.

Підготовка самок калянуса до синхронізації одержання яєць.

Самок калянуса промивали стерильною морською водою і поміщали в контейнери зі стерильною морською водою при мінімальному обсязі 10 мл на самку при температурі 7±1°C. У таких умовах самок утримували від 1 до 14 діб, при щоденній заміні 0,1 обсягу води. У процесі утримання при низькій температурі віковий склад у самок калянусів, готових до вимету гамет, синхронізувався.

Одержання яєць калянуса.

Для переведення самок у режим розмноження розводили середовище, у якому знаходилися самки, стерильною морською водою до 100 мл на особину, і переносили посудини на розсіяне світло (оптимум 500 люкс)

при температурі $15 \pm 1^\circ\text{C}$ з додаванням оптимального для виробництва яєць і життєздатності наупліїв корму - мікроводоростей *Euxiella cordata* (концентрація $5 \cdot 10^4$ кл/мл).

Через 24 години одержували до 10-30 яєць на самку за добу» у залежності від вихідного стану статевозрілої самки. Яйця калянусів одержували щодоби протягом від 14 до 30 діб (у залежності від якості вихідного матеріалу), після чого самок заміняли новою партією.

Викльовування наупліїв з яєць.

Яйця, що були відокремлені за допомогою сита з розміром вічка 70 мкм, обробляли дезінфікуючим розчином протягом 30 хв і пересаджували в інкубатори зі стерильною морською водою при щільності 10 екз/мл. При температурі $16 \pm 1^\circ\text{C}$ через добу з яєць масово викльовувалися перші наупліальні стадії калянусів. Життєздатні науплії складали до 95% від загальної маси зібраних яєць. При необхідності, викльовування наупліїв із зібраних яєць затримували на добу, шляхом тимчасового переміщення їх у темряву відразу після збору при температурі $7 \pm 1^\circ\text{C}$.

Одержання синхронних вікових когорт калянуса

З загальної маси життєздатних наупліїв відбирали необхідну для проведення експериментів партію, яку переводили на дорощування до необхідної стадії розвитку (розмірної групи). Наупліїв при щільності 5 екз/мл поміщали в стерильну морську воду солоністю 18‰ при температурі $17 \pm 1^\circ\text{C}$ і освітленості 1000-2000 люкс. Для стабілізації середовища додавали примієзійофітові мікроводорості *Ischraxis galbana* (клон T-Iso) (експонентна фаза росту), в концентрації 10^3 кл/мл. Через добу науплії проходили перше линяння і переходили у другу наупліальну стадію N2 (першу стадію, що живиться). Як корм наупліям додавали 10^5 кл/мл ($0.9 \text{ мкг C.мл}^{-1}$) T-Iso. Таку концентрацію корму підтримували до четвертої доби після викльовування.

Наприкінці четвертої доби після викльовування, коли 50% наупліїв переходили в четверту наупліальну стадію N4, склад корму модифікували: до $4,5 \cdot 10^4$ кл/мл T-Iso додавали $0,5 \cdot 10^4$ кл/мл дінофлагеллят *Euxiella cordata* (Ех), тобто при співвідношенні концентрації клітин водоростей 4:1. У сукупності ця концентрація клітин суміші кормових мікроводоростей складала $5 \cdot 10^4$ кл/мл.

Щодня протягом наупліального періоду обсяг стерильної води збільшували вдвічі для зниження щільності наупліїв і коректували концентрацію мікроводоростей. Протягом 7-8 діб після викльовування з яєць відбувалося 5 послідовних наупліальних линянь, що приводять до одержання останньої шостий наупліальної стадії N6.

З другого тижня культивування (8-10 діб після викльовування) відбувався масовий перехід від наупліальних до копеподитних стадій калянуса. Морську воду, у якій знаходилися калянуси, замінювали на 75% і доводили до обсягу, що відповідав 20 мл на 1 копеподита C1. До початку копеподитного періоду когорт калянуса щільність організмів у культурі складала не більш $0,05$ екз/мл. Обсяг води щодоби підмінювали на 0,2 обсягу і робили поступове розведення щільності калянусів, таким чином, щоб на 15 добу на 1 калянуса приходилося 80 мл середовища. Концентрацію мікроводоростей у культурі калянусів з 9 до 15 доби підтримували на рівні $3 \cdot 10^4$ кл/мл суміші двох мікроводоростей T-Iso і Ех у співвідношенні концентрації кліток 2:1.

Починаючи з 15 доби (копеподитної стадії C3) до 18 доби після викльовування з яйця, калянусів годували сумішшю дінофлагеллят: $5 \cdot 10^3$ кл/мл Ех, і 10^3 кл/мл *Proocentrum micans* (Рмс). Сукупна концентрація кліток цих видів мікроводоростей у культурі калянуса складала $6 \cdot 10^3$ кл/мл суміші при співвідношенні видів 5:1.

З 18 доби після викльовування з яйця (при переході до четвертої копеподитної стадії C4) калянусів продовжували годувати сумішшю Ех і Рмс, але співвідношення концентрацій клітин переміщали у бік більш великих клітин (3:1), що складала в сукупності $4 \cdot 10^3$ кл/мл.

З 21 доби після досягнення п'ятої копеподитної стадії (C5), калянуса годували виключно Рмс, концентрацію клітин якого підтримували на рівні $2 \cdot 10^3$ кл/мл до досягнення стадії дорослого калянуса (C6), тобто до 28-31 доби вирощування калянуса від яйця.

У результаті одержали наступні тимчасові когорти калянуса (табл. 1).

Таблиця 1

Стадія	Розмір (цм)	Вік (доба)	Щільність (екз./мл)	Корм (кл/мл)
яйця	190±5	0	10	0
науплій N1	212.5±12.5	1	5	10^3
науплій N2	300±25	2	2.5	10^5
науплій N3	390±35	3	1	10^5
науплій N4	490±45	4-5	0.5	$5 \cdot 10^4$
науплій N5	560±65	6-7	0.25	$5 \cdot 10^4$
науплій N6	680±70	7-9	0.1	$5 \cdot 10^4$
копеподит C1	925±25	10-12	0.05	$3 \cdot 10^4$
копеподит C2	1145±105	12-15	0.025	$3 \cdot 10^4$
копеподит C3	1650±150	15-18	0,0125	$6 \cdot 10^3$
копеподит C4	2050±175	18-21	0.006	$4 \cdot 10^3$
копеподит C5	2500±200	21-27	0.003	$2 \cdot 10^3$
копеподит C6	3100±300	28-31	0.003	$2 \cdot 10^3$

Розмірний склад когорт чорноморського калянуса, які культивували, змінювався від 212.5 ± 12.5 до 3100 ± 300 мкм відповідно стадіям розвитку (N1 до C6) в усередненій термін одержання їх (від 1 до 28-31 доби) при приведених стандартних трофічних умовах і щільності культивування, при стандартній температурі культивування ($17 \pm 1^\circ\text{C}$). Розмір (у мікронах) відповідає для яйця - його діаметру; для вікових стадій калянуса - його загальній довжині.

Мінімальний час генерації (від викльовування з яйця до досягнення стадії C6) при оптимальному живленні був рівний 30 добам (при середньодобовій температурі $17 \pm 1^\circ\text{C}$), максимальний - 60 добам (при середньодобовій

температурі $9 \pm 1^{\circ}\text{C}$). Максимальна виживаність від стадії яйця до дорослого калянуса при застосуванні запропонованого методу культивування - 50%.

Спосіб культивування каланоїдних копепод *Calanus euxinus* (чорноморського калянуса), що заявляється, володіє ряд переваг:

уперше запропоновані оптимальні температурні, трофічні і щільнісні умови для синхронізації і стандартизації процесів продукування яєць самками калянусів, розвитку і викльовування яєць калянусів, розвитку і росту молоді калянусів до досягнення останньої життєвої стадії;

проведення дезінфекції яєць дозволяє звільнитися від патогенних мікроорганізмів, що впливають як на виживаність самих калянусів, так і, при використанні їх як живі корми, на виживаність личинок риб;

пропонований спосіб дозволяє здійснювати попередню оцінку кількості і якості одержуваного матеріалу.