



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2015151334, 30.11.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
30.11.2015Дата регистрации:
28.03.2017

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 30.11.2015

(45) Опубликовано: 28.03.2017 Бюл. № 10

Адрес для переписки:

299011, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2,
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки "Институт морских
биологических исследований им. А.О.
Ковалевского РАН"

(72) Автор(ы):

Рауэн Татьяна Владимировна (RU),
Муханов Владимир Сергеевич (RU),
Ханайченко Антонина Николаевна (RU),
Гирагосов Виталий Евгеньевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки "Институт морских
биологических исследований им. А.О.
Ковалевского РАН" (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: SU 847961 A1, 23.07.1981. US
5961831 A1, 05.10.1999. BY 10942 C1,
30.08.2008.

(54) Способ снижения численности бактерий-оппортунистов в средах выращивания личинок морских рыб и их кормов

(57) Реферат:

Перед помещением икры в инкубатор предварительно инокулируют культуру микроводоросли *Chlorella vulgaris*. В выростные емкости с личинками на стадии эндогенного питания также добавляют культуру хлореллы. На стадии экзогенного питания личинок рыб коловратками в среду добавляют фильтрат

хлореллы. Перед закладкой цист артемий на выклев культуру хлореллы добавляют в среду культивирования. Изобретение обеспечивает оптимальные микробиологические условия в системе искусственного выращивания рыб и их кормовых организмов без применения антибиотиков. 2 з.п. ф-лы, 1 табл., 1 пр.

RU 2 614 604 C1

RU 2 614 604 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2015151334, 30.11.2015

(24) Effective date for property rights:
30.11.2015Registration date:
28.03.2017

Priority:

(22) Date of filing: 30.11.2015

(45) Date of publication: 28.03.2017 Bull. № 10

Mail address:

299011, g. Sevastopol, pr. Nakhimova, 2, Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe uchrezhdenie nauki "Institut morskikh biologicheskikh issledovanij im. A.O. Kovalevskogo RAN"

(72) Inventor(s):

Rauen Tatyana Vladimirovna (RU),
Mukhanov Vladimir Sergeevich (RU),
Khanajchenko Antonina Nikolaevna (RU),
Giragosov Vitalij Evgenevich (RU)

(73) Proprietor(s):

Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe uchrezhdenie nauki "Institut morskikh biologicheskikh issledovanij im. A.O. Kovalevskogo RAN" (RU)

(54) **METHOD FOR REDUCING NUMBER OF BACTERIA-OPPORTUNISTS IN GROWING MEDIA FOR MARINE FISH LARVAE AND THEIR FODDER**

(57) Abstract:

FIELD: agriculture.

SUBSTANCE: before placing the eggs into the incubator, the culture of microalgae *Chlorella vulgaris* is pre-inoculated. The culture of chlorella is also added into rearing containers with larvae at the endogenous feeding phase. At the stage of exogenous feeding the fish larvae with rotifers, the chlorella filtrate is added

to the medium. Before laying the *Artemia* cysts for hatching, the chlorella culture is added to the cultivation medium.

EFFECT: optimal microbiological conditions in the artificial rearing system of fish and organisms for their feeding without the use of antibiotics.

3 cl, 1 tbl, 1 ex

RU 2 614 604 C1

RU 2 614 604 C1

Изобретение относится к марикультуре, может быть использовано на рыбоводных предприятиях и предназначено для повышения качества среды выращивания кормовых организмов и рыб.

Одна из самых актуальных проблем в технологии выращивания морских рыб - непредсказуемая массовая смертность личинок на ранних стадиях развития, обусловленная вспышками бактериальных инфекций. Особенно чувствительны к инфекциям личинки камбалообразных, так как на ранних стадиях развития их иммунная и пищеварительная система развиты слабо. Выживаемость, рост и развитие искусственно выращиваемых личинок камбалообразных в значительной степени зависят от микробиологических условий в течение эмбрионального развития и на стадии кормления личинок живыми кормами. В связи с этим данное изобретение тестировалось именно в рамках технологической схемы выращивания черноморского калкана.

Известен способ культивирования морских гидробионтов в выростных емкостях, замкнутых в общую автоматизированную систему. Перед подачей воды в бассейны с животными вода проходит фильтрацию и обработку озоном (Automated closed recirculating aquaculture filtration system and method US 5961831 A). Данный способ эффективно элиминирует бактерии и позволяет отказаться от антибиотиков. Однако этот метод имеет ряд недостатков. Во-первых, в некоторых случаях автоматическая очистка воды может быть причиной травматизации организмов, в частности икры. Во-вторых, бактерицидное действие озона обусловлено тем, что он образует с компонентами морской воды окисляющие соединения, которые разрушают оболочку бактерий. Образующиеся соединения могут также вступать в реакцию с оболочкой икры - хорионом, нарушая его биохимическую структуру и изменяя функциональные свойства. Поэтому, несмотря на высокую бактерицидную эффективность озона, его применение должно быть строго регламентировано. Кроме того, как показали наши исследования, разовая обработка среды инкубации икры озоном приводит к массовому неселективному снижению численности бактерий, и в отсутствие постоянного озонирования после непродолжительной лаг-фазы в среде наблюдается вспышка численности быстро растущей оппортунистической микрофлоры. Кроме того, наши исследования также показали, что озонированная вода (при уровне концентрации озона в пределах биологической толерантности дезинфицируемых организмов) недостаточно эффективно элиминирует бактерии, прикрепленные к поверхности организмов.

Известен способ искусственного разведения черноморского калкана, включающий в себя инкубацию икры в инкубаторах, перенос личинок после выклева в выростные бассейны, их обеспечение специально подготовленными живыми кормами. В данном способе очистку воды и водообмен в инкубаторах осуществляют путем использования биофильтра и замкнутой системы циркуляции воды, а обеззараживание производят за счет внесения антибиотиков (Пат. 847961, МПК А01К 61/00, СССР). Этот способ, с технической точки зрения, целесообразен. Однако обеззараживание воды с помощью внесения антибактериальных препаратов не решает проблемы бактериальных контаминаций, поскольку бактерии могут приобретать резистентность к используемым антибиотикам, нарушается сбалансированное микробиологическое сообщество среды, антибиотики накапливаются в культивируемых организмах и могут загрязнять окружающую среду. Негативные аспекты применения антибиотиков обуславливают альтернативные решения проблемы бактериальных контаминаций сред выращивания аквакультурных организмов.

Задачей способа снижения численности бактерий-оппортунистов в средах выращивания личинок морских рыб и их кормов является формирование оптимальных

микробиологических условий в системе искусственного выращивания рыб и их кормовых организмов путем снижения численности бактерий как в искусственных средах инкубации икры и выращивания личинок морских рыб на ранних стадиях развития, так и в средах культивирования их живых кормовых организмов (микроводорослей, коловраток, артемий).

Поставленная задача решается тем, что для обеззараживания среды перед помещением икры, в инкубатор предварительно инокулируют культуру микроводоросли *Chlorella vulgaris* (концентрация клеток в среде инкубирования $\approx 2 \cdot 10^5$ кл·мл⁻¹), а в выростные емкости с личинками на стадии эндогенного питания добавляют культуру *Ch. vulgaris* из расчета $\approx 4 \cdot 10^4$ кл·мл⁻¹, затем на стадии экзогенного питания личинок рыб коловратками в среду добавляют фильтрат хлореллы из расчета 50 мл·л⁻¹, концентрация исходной культуры микроводорослей $\approx 10^7$ кл·мл⁻¹; перед закладкой цист артемий на выклев культуру *Ch. vulgaris* добавляют в среду культивирования артемий из расчета $\approx 0,4 \cdot 10^6$ кл·мл⁻¹. В способе используют культуру *Ch. vulgaris*, находящуюся в конце фазы экспоненциального роста. В инкубаторах икру после добавления культуры *Ch. vulgaris* выдерживают 1 час без протока, повторяя процедуру ежедневно после чистки дна инкубаторов вплоть до выклева.

Основными векторами передачи патогенных бактерий личинкам рыб при искусственном выращивании являются поверхность икры, среда выращивания и кормовые организмы (коловратки, артемий). В отсутствие правильной дезинфекции икры, через нее могут передаваться бактериальные инфекции от производителей к личинкам.

Колонизация поверхности икры бактериями (формирование эпифлоры икры) происходит в течение нескольких часов после оплодотворения. Бактерии, входящие в состав эпифлоры, вырабатывают протеолитические ферменты, которые могут негативно влиять на развитие эмбриона; обрастание икры препятствует его дыханию, замедляя развитие и выклев. Одним из альтернативных методов снижения уровня бактериальной контаминации (и особенно снижения титра быстро растущих потенциальных патогенов - бактерий-оппортунистов) среды выращивания является использование антибактериальных свойств одноклеточных микроводорослей. Известна антибактериальная активность микроводорослей рода *Chlorella*, которая была обнаружена в 1940-х годах (Pratt et al., 1944), однако до настоящего времени функциональные механизмы этой активности неясны. Для ассоциированной микрофлоры неаксеничных культур микроводорослей рода *Chlorella* характерно присутствие преимущественно грампозитивных бактериальных изолятов, около 30% которых ингибируют *in vitro* рост известных патогенов (Makridis et al., 2006). Но и аксеничные культуры видов рода *Chlorella*, в отсутствие культивируемых ассоциируемых бактерий, оказывают достоверное ингибирование *in vitro* известных патогенов рыб рода *Vibrio* (Kokou et al., 2012). Бактерицидная активность хлореллы, по-видимому, связана также с ее экзометаболитами, в составе которых обнаружено до 25-40% полисахаридов (Lewin, 1962), значительное количество гликолевой кислоты (Watt, Fogg, 1966; Максимова, Даль, 1975), а также муравьиной и уксусной кислот (Максимова, Пименова, 1969).

Переход личинок на экзогенное питание живыми кормами - наиболее проблемный в отношении возможных вспышек бактериальных инфекций этап культивирования рыб. Начало питания (открытие пищеварительного канала) инициирует колонизацию кишечника личинок микрофлорой, ассоциированной со средой выращивания и живыми кормами, в составе которой могут быть и условно патогенные бактерии (в том числе

и переданные через икру от производителей). В интенсивных условиях выращивания, при высоких плотностях культивируемых организмов (например, коловраток), складывается благоприятная для быстрого роста оппортунистических бактерий среда и их патогенность повышается, что приводит к вспышкам инфекционных заболеваний и смертности личинок. В поверхностных слоях внешней оболочки артемий - живого кормового организма, которым кормят выращиваемых личинок калкана, также локализуется значительное число бактерий, которые не всегда элиминируются дезинфицирующими средствами.

Технический результат, проявляющийся при осуществлении способа, заключается в том, что:

- применение *Ch. vulgaris* позволяет создать оптимальные условия культивирования личинок за счет внесения в среды выращивания вместе с культурой хлореллы ее метаболитов, обладающих антибактериальным действием, а также заселения сред выращивания ассоциированными с хлореллой бактериями, благоприятными для жизнедеятельности личинок (эубиотиками), сдерживающими рост оппортунистической микрофлоры;

- формирование здорового сбалансированного микробиологического сообщества путем внесения неаксеничной культуры *Ch. vulgaris* с ассоциированной микрофлорой при открытии личинками рта и пассивном заглатывании воды обеспечивает первичную колонизацию кишечника личинок здоровой микрофлорой и сдерживает рост численности бактерий-оппортунистов в среде выращивания при переходе личинок на экзогенное питание;

- использование *Ch. vulgaris* при инкубации артемий позволяет увеличить синхронность выклева артемий из цист, снизить уровень бактерий в среде инкубации цист и интенсивность бактериальной колонизации поверхности науплиев и метанауплиев *Artemia salina* - потенциального вектора передачи патогенных бактерий личинкам рыб;

- вид *Ch. vulgaris* является технологичным, а получение необходимой биомассы этого вида микроводорослей возможно в короткие сроки;

- условия инкубации икры, культивирования личинок и их кормовых организмов приближаются к естественным, что позволяет избежать рисков, связанных с применением антибиотиков или других дезинфицирующих средств, и повысить качество аквакультурной продукции;

- снижается интенсивность бактериальной колонизации поверхности икры и среды ее инкубации, и, тем самым, снижается вероятность вспышки инфекционных заболеваний личинок рыб.

Заявляемый способ соответствует критериям новизны и технического уровня, т.к. впервые предложена альтернативная химическим способам дезинфекции методика снижения численности оппортунистических бактерий на проблемных в отношении возможной вспышки патогенных инфекций этапах культивирования морских рыб и их кормовых организмов; впервые предложен способ использования фильтрата микроводоросли *Ch. vulgaris* в качестве антибактериального агента в среде выращивания при питании личинок живыми кормовыми организмами. Применение свежего фильтрата позволяет снизить уровень бактерий в среде, сохраняя необходимый, соответствующий технологии выращивания, баланс численности организмов (личинки/кормовые объекты), избежать нежелательного изменения биохимического состава коловраток, который может произойти в результате их питания хлореллой.

Изобретение реализуется следующим образом:

1. Инкубацию икры проводят при стандартных условиях. Перед помещением в

инкубаторы икру промывают озонированной водой с целью обеззараживания, затем помещают в инкубаторы, в которые предварительно инокулируют культуру микроводоросли *Chlorella vulgaris*, до достижения их концентрации в среде инкубации $\approx 2 \cdot 10^5$ кл·мл⁻¹, и выдерживают около 1 часа без протока. Процедуру повторяют ежедневно, после чистки дна инкубаторов вплоть до выклева. Присутствие хлореллы позволяет снизить более чем вдвое интенсивность бактериальной колонизации поверхности икры и сбалансировать бактериальное сообщество в среде инкубации, так как в присутствии хлореллы в бактериальном сообществе доминируют медленно растущие, преимущественно К-стратеги.

2. После переноса выклюнувшихся личинок в выростные бассейны, накануне перехода личинок от стадии эндогенного питания к экзогенному питанию, для предупреждения вспышки численности оппортунистических бактерий и для создания сбалансированного микробиального сообщества в воде, которую пассивно заглатывают личинки и которая может формировать первичную микрофлору кишечника личинок, в выростные емкости добавляют культуру *Ch. vulgaris* в из расчета $\approx 4 \cdot 10^4$ кл·мл⁻¹.

3. На стадии экзогенного питания для предупреждения роста численности бактерий в среде с личинками, активно питающимися коловратками, в выростные емкости добавляют только фильтрат культуры хлореллы (без клеток) (50 мл·л⁻¹, концентрация исходной культуры $\approx 10^7$ кл·мл⁻¹), т.к. коловратки могут дать дополнительную нежелательную вспышку численности и изменить в неблагоприятную для личинок рыб сторону свой биохимический состав в результате питания клетками хлореллы.

4. При инкубации цист артемий с целью получения науплиев, второго кормового организма личинок рыб, культуру *Ch. vulgaris* добавляют в среду перед закладкой цист на выклев из расчета $\approx 0,4 \cdot 10^6$ кл·мл⁻¹. Присутствие *Ch. vulgaris* в среде инкубации артемий снижает колонизацию покровов науплиев бактериями, сокращает время выклева науплиев из цист и обеспечивает более синхронный метаморфоз артемий при переходе от науплиальной к метанауплиальной стадии.

Во всех случаях (1-4) используют культуру *Ch. vulgaris*, находящуюся в конце фазы экспоненциального роста (при концентрации $4 \cdot 10^7$ кл·мл⁻¹), которую предварительно адаптируют в течение нескольких часов к условиям дальнейшего использования (температура, освещенность).

Предложенные цифровые значения есть результат многочисленных экспериментов, проведенных авторами, позволяющих выполнить поставленную задачу максимально эффективно.

Дополнительно к операциям известной технологии культивирования камбалы/калкан проводят:

- 1) Культивирование микроводоросли *Ch. vulgaris* в соответствии со стандартными методиками;
- 2) Подготовку фильтрата культуры *Ch. Vulgaris*;
- 3) Инкубацию икры с добавлением *Ch. Vulgaris*;
- 4) Культивирование коловраток *Brachionus plicatilis* в соответствии со стандартными методиками;
- 5) Добавление фильтрата *Ch. vulgaris* одновременно с коловратками в среду культивирования личинок;

б) Инкубацию цист артемий с целью получения науплиев с добавлением *Ch. vulgaris*.

Пример реализации способа

Предлагаемый способ снижения численности бактерий-оппортунистов в средах выращивания личинок морских рыб и их кормов был успешно апробирован при инкубации икры и выращивании личинок черноморского калкана и его основных кормовых организмов (коловраток, артемий) в пилотных установках. Методом проточной цитометрии с предварительной окраской бактерий флуоресцентным ДНК маркером было подтверждено, что в средах инкубации икры, выращивания личинок на стадиях эндо- и экзогенного питания, инкубации артемий *A. salina* с добавлением клеток и фильтрата *Ch. vulgaris* численность бактерий была достоверно ниже, чем в контроле. Интенсивность бактериальной колонизации поверхности икры и науплиев артемий также была достоверно ниже таковой в контроле.

Культивирование микроводоросли *Ch. vulgaris* в соответствии со стандартными методиками.

Микроводоросли *Ch. vulgaris* были получены из коллекции живых культур морских микроводорослей отдела экологической физиологии водорослей ФГБУН ИМБИ (г. Севастополь). Культуры выращивали в накопительном режиме на среде Уолна при температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Освещение осуществляли круглосуточно с помощью люминесцентных ламп LD-40 при интенсивности 5000 люкс. Культуру *Ch. vulgaris* адаптировали к условиям дальнейшего использования в течение суток. Численность клеток в исходной культуре хлореллы, использованной на разных этапах культивирования, составляла $2 \cdot 10^7 - 10^7$ кл.мл⁻¹.

Подготовка фильтрата культуры *Ch. vulgaris*

Фильтрат готовили из культуры микроводоросли *Ch. Vulgaris*, находящейся в экспоненциальной фазе роста, с помощью 47-мм нитроцеллюлозных мембран (диаметр пор 0,2 мкм) и фильтровального оборудования Sartorius (Германия). Численность клеток в исходной культуре хлореллы, из которой готовили фильтрат, составляла $\approx 10^7$ кл.мл⁻¹. Клетки *Ch. vulgaris*, отделенные от фильтрата, в дальнейшем использовали при выращивании культур коловраток.

Процедура инкубации икры с добавлением *Ch. vulgaris*.

Оплодотворенную икру на стадии бластулы промывали подготовленной морской водой и помещали в инкубаторы, куда предварительно добавляли культуру *Ch. vulgaris*. Плотность икры в инкубаторах составляла ≈ 1000 экз.·л⁻¹, клеток *Ch. vulgaris* $0,2 \cdot 10^6$ кл.мл⁻¹.

Культивирование коловраток *B. plicatilis* в соответствии со стандартными методиками. Партеногенетический клон коловраток *B. plicatilis* культивировали в накопительном режиме при постоянном освещении и температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$, используя подготовленную морскую воду (фильтрация через картриджные фильтры 10, 5, 1 мкм, обработка ультрафиолетом, пастеризация).

Процедура добавления коловраток и фильтрата *Ch. vulgaris* в среду культивирования личинок.

Для оптимизации биохимического состава коловраток как кормового организма для личинок рыб их предварительно концентрировали и насыщали соответствующими видами микроводорослей, затем промывали проточной морской водой и помещали в емкости с начинающими экзогенно питаться личинками, в выростную среду которых предварительно был добавлен фильтрат хлореллы. Плотность посадки личинок составляла 40 экз.·л⁻¹. Средняя плотность коловраток в выростных емкостях личинок составляла примерно - 5 экз.·мл⁻¹. Фильтрат хлореллы добавляли в среду с личинками

из расчета 50 мл, концентрация исходной культуры $\approx 10^7$ кл·мл⁻¹.

Процедура получения науплиев из цист артемий с добавлением *Ch. vulgaris*.

Предварительно декапсулированные цисты артемий помещали в конические сосуды, содержащие стерильную морскую воду, и содержали при температуре 28°C, постоянном освещении 5 тыс. люкс и интенсивном барботаже. Исходная концентрация цист артемий составляла 1 г·л⁻¹, концентрация добавленных в инкубационную среду клеток хлореллы $0,4 \cdot 10^6$ кл·мл⁻¹. Выклюнувшихся науплиев отделяли от оболочек, после чего концентрировали и промывали стерильной морской водой.

Таблица 1. Схема использования микроводоросли *Ch. vulgaris* в качестве антибактериального агента в системе искусственного выращивания личинок морских рыб и их кормовых организмов на примере черноморского калкана.

Этап применения <i>Ch. vulgaris</i>	Плотность посадки организмов	Концентрация клеток <i>Ch. vulgaris</i> в среде (кл. мл ⁻¹)	Объём фильтрата/на 1 л среды
Инкубация икры	1000 экз л ⁻¹	$\approx 2 \cdot 10^5$	–
Личинки на стадии эндогенного питания	40 экз·л ⁻¹	$\approx 4 \cdot 10^4$	–
Личинки на стадии экзогенного питания	40 экз·л ⁻¹	–	50 мл·л ⁻¹ , исходная культура $\approx 10^7$ кл·мл ⁻¹
Инкубация артемий	5 мг сыр. в. л ⁻¹	$\approx 4 \cdot 10^5$	–

Таким образом, применение микроводоросли *Ch. vulgaris* по разработанной схеме позволяет сформировать оптимальные микробиологические условия в системе искусственного выращивания рыб и их кормовых организмов. Данный способ обеспечивает снижение численности бактерий-оппортунистов, обеспечивая сбалансированное бактериальное сообщество в средах выращивания организмов, снижение интенсивности бактериальной колонизации их поверхности без применения антибиотиков и, как следствие, повышение качества и выживаемости личинок на ранних стадиях развития.

(57) Формула изобретения

1. Способ снижения численности бактерий-оппортунистов в средах выращивания личинок морских рыб и их кормов, включающий инкубацию икры в инкубаторах, перенос личинок в выростные бассейны, обеспечение специально подготовленными живыми кормами и обеззараживание среды выращивания, отличающийся тем, что для обеззараживания среды перед помещением икры в инкубатор предварительно инокулируют культуру микроводоросли *Chlorella vulgaris* (концентрация клеток в среде инкубирования $\approx 2 \cdot 10^5$ кл·мл⁻¹), а в выростные емкости с личинками на стадии эндогенного питания добавляют культуру *Ch. vulgaris* из расчета $\approx 4 \cdot 10^4$ кл·мл⁻¹, затем на стадии экзогенного питания личинок рыб коловратками в среду добавляют фильтрат хлореллы из расчета 50 мл·л⁻¹, концентрация исходной культуры $\approx 10^7$ кл·мл⁻¹ среды с

личинками, и перед закладкой цист артемии на выклев культуру *Ch. vulgaris* добавляют в среду культивирования артемий из расчета $\approx 0,4 \cdot 10^6$ кл·мл⁻¹.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что используют культуру *Ch. vulgaris*, находящуюся в конце фазы экспоненциального роста.

5 3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что в инкубаторах икру после добавления культуры *Ch. vulgaris* выдерживают 1 час без протока, повторяя процедуру ежедневно после чистки дна инкубаторов вплоть до выклева.

10

15

20

25

30

35

40

45