



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2015147611, 05.11.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
05.11.2015Дата регистрации:
28.03.2017

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 05.11.2015

(45) Опубликовано: 28.03.2017 Бюл. № 10

Адрес для переписки:

299011, г.Севастополь, пр. Нахимова, 2, ФГБУН
"Институт морских биологических исследований
им. А.О. Ковалевского РАН"

(72) Автор(ы):

Ханайченко Антонина Николаевна (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: RU 2541458 C1, 10.02.2015. UA
79254 C2, 11.06.2007. UA 81055 U, 25.06.2013.

(54) Способ интенсивного когортного культивирования акарий (морских каланоидных копепод)

(57) Реферат:

Способ включает получение взрослых половозрелых особей из природных условий и выдерживание их в дезинфицирующем растворе. Из яиц от половозрелых копепод в возрасте 11-12 суток формируют маточное стадо акарий при плотности не более 300 экз./л, которых кормят смесью микроводорослей *Isochrysis galbana*, *Rhodomonas baltica*, *Prorocentrum minimum* в объемном соотношении культур 1:1:1 при аэрации не более 500 мл/мин с освещением сверху, с регулярной подменой свежей дезинфицированной морской воды. Через сутки и в течение

последующих 10 суток производят сбор яиц, для чего ежедневно через каждые 12 часов отключают аэрацию и через 30 мин после ее отключения производят слив 0,01 части общего объема морской воды. Яйца акарий собирают на сито, отмывают и дезинфицируют. Затем в течение 24 часов проводят инкубацию яиц акарий до выклева науплиев, из которых выращивают возрастные когорты акарий. Изобретение обеспечивает получение и длительную эксплуатацию массовой искусственной моновидовой популяции акарий. 1 табл., 1 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2015147611, 05.11.2015**(24) Effective date for property rights:
05.11.2015Registration date:
28.03.2017

Priority:

(22) Date of filing: **05.11.2015**(45) Date of publication: **28.03.2017** Bull. № 10

Mail address:

**299011, g.Sevastopol, pr. Nakhimova, 2, FGBUN
"Institut morskikh biologicheskikh issledovanij im.
A.O. Kovalevskogo RAN"**

(72) Inventor(s):

Khanajchenko Antonina Nikolaevna (RU)

(73) Proprietor(s):

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

(54) **METHOD OF INTENSIVE COHORT CULTIVATION OF ACARTIA (SEA CALANOID COPEPODS)**

(57) Abstract:

FIELD: agriculture.

SUBSTANCE: method includes receiving adult mature specimens from the natural environment and maintaining them in a disinfectant solution. From the eggs of adult copepods in the age of 11-12 days the acartia broodstock is formed at a density of less than 300 specimens / l, which is fed with the mixture of microalgae *Isochrysis galbana*, *Rhodomonas baltica*, *Prorocentrum* at the minimum volume ratio of cultures 1:1:1 with the aeration of no more than 500 ml/min, with lighting from above, with the regular replacement of fresh disinfected seawater. After one day, and over

the next 10 days, the eggs are collected, for which purpose every 12 hours daily the aeration is turned off, and 30 minutes after 0.01 part of total seawater amount is drained off. The *Acartia* eggs are collected on a sieve, washed and disinfected. Then, within 24 hours, the incubation of *Acartia* eggs is performed, until the nauplii are hatched, of which the age cohorts of *Acartia* are reared.

EFFECT: obtaining and long-term operating a mass artificial monospecific population of *Acartia*.

1 tbl, 1 ex

Изобретение относится к области морской аквакультуры и предназначено для получения кормовых организмов и может быть использовано при культивировании ценных морских рыб и ракообразных на ранних стадиях развития, а также для проведения экспериментальных работ по морской биологии, планктонологии, физиологии и биохимии и для биологического тестирования в области морской токсикологии.

Характерной чертой многих морских рыб и особенно ценных видов камбалообразных является облигатное для ранних стадий развития личинок питание живыми кормами. Копеподы являются первыми кормовыми организмами личинок рыб в естественных условиях.

В отличие от кормовых организмов коловраток и артемий, стандартно применяемых в интенсивной ларвикультуре рыб, морские каланоидные копеподы обеспечивают нормальное развитие личинок морских рыб, так как их химический состав адекватен потребностям личинок по соотношению незаменимых компонентов: жирных кислот, каротиноидов, аминокислот и др. Но получение копепод путем отлова естественного планктона нецелесообразно из-за сезонной вариабельности и зависимости от погодных условий. Кроме того, при искусственном выращивании личинок рыб включение в их рацион копепод, отловленных из естественной среды, может стать причиной заражения рыб нежелательными инфекционными заболеваниями. Для разработки технологии выращивания в искусственных условиях высококачественной молоди морских рыб с характеристиками, близкими к «дикому» типу, необходима разработка высокоэффективной технологии культивирования копепод, являющихся единственно адекватными кормовыми организмами, обеспечивающими правильное скелетообразование, пигментацию, развитие пищеварительной и иммунной систем личинок морских рыб.

Известен способ культивирования веслоногих ракообразных (веслоногие ракообразные синоним - копепод) (Пат. 34843, МПК А01К 61/00, Украина). Способ предусматривает внесение кварцевого песка, неорганических и органических удобрений в пруды или цементные бассейны, которые стимулируют спонтанное последовательное развитие бактериопланктона, фитопланктона, простейших и зоопланктона, в состав которого входят веслоногие ракообразные (копеподы) разных видов и который позволяет начинать получать продукцию копепод через 50 сут после инокуляции их в выростные объемы. Основными недостатками этого метода является необходимость использования больших прудов для выращивания (минимум 750 м³), многокомпонентность пищевой цепи, включающая слабoreгулируемое наращивание сначала бактериально-инфузорного комплекса, затем фитопланктона, затем зоопланктонного комплекса (без конкретизации видового состава каждого из вышеперечисленных уровней пищевой цепи) и, как результат, слабая регуляция выхода продукции веслоногих ракообразных в смеси разнообразных беспозвоночных.

Известен способ культивирования каланоидных копепод *Arctodiaptomus salinus* (Daday) (Пат. 81055, МПК А01К 61/00, Украина). Недостатки способа заключаются в том, что данный вид копепод вынашивает яйца в яйцевых мешках, а не выметывает их в воду (как акарции), что усложняет возможность сбора яиц и их инкубацию в отдельных емкостях, а также долговременный период генерации, удлиняющий сроки производства живого корма данного вида.

Известен способ культивирования каланоидных копепод *Calanus euxinus* (черноморского калануса) - вида наиболее крупных каланоидных копепод низкотемпературного глубоководного комплекса Черного моря (Пат.79254, МПК

А01К 61/00, Украина), который включает выделение диких самок калянуса из зоопланктонных ловов, содержание их в условиях культивирования и получение от них в течение нескольких месяцев яиц и последовательное получение синхронных возрастных когорт науплиев и копеподитов. Основными недостатками этого способа является то, что он базируется на регулярном получении производителей (самок копепод рода калянус) из моря, т.е. зависит от сезонных и погодных факторов; и то, что он предназначен для культивирования крупных копепод глубоководного морского комплекса, имеющих термопреферендум в области низких температур ($\leq 15^{\circ}\text{C}$) и, соответственно, замедленные темпы развития от науплиальных до копеподитных стадий (около 30 сут), что затрудняет быстрое получение массового количества необходимых стадий копепод.

Задачей «Способа интенсивного когортного культивирования каланоидных копепод (веслоногих ракообразных) рода акарции» является разработка технологии, обеспечивающей получение массовой искусственной моновидовой популяции акарций в короткие временные сроки и ее длительную эксплуатацию в течение множественных (более 100) поколений, регулярное (ежедневное) получение определенной продукции яиц, ежедневное получение из них науплиев и выращивание стандартизированной продукции размерно-возрастных категорий (когортных групп) акарций за определенные временные сроки.

Поставленная задача достигается тем, что молодых самок и самцов акарций, отловленных из естественной зоопланктонной пробы, выдерживают в дезинфекционном растворе, адаптируя к температуре культивирования в течение 6-7 часов с добавлением культивируемого корма, после чего осуществляют их подготовку для синхронного получения массы яиц, которые отмывают в дезинфекционном растворе и затем инкубируют в течение 24 часов, получая одновозрастных науплиев, которые в дальнейшем культивируют, получая синхронные возрастные когорты акарций, которые в зависимости от размера (возраста) используются для кормления личинок рыб на разных стадиях их развития.

Для выполнения поставленной задачи из первого поколения копепод, полученного от самок, отловленных из природной популяции, в возрасте 11-12 суток (при соотношении самцов к самкам не менее 1:4), формируют маточное стадо акарций при плотности не более 300 экз./л, ежедневно получают яйца. Акарций кормят смесью микроводорослей *Isochrysis galbana*, *Rhodomonas baltica*, *Prorocentrum minimum* в объемном соотношении культур 1:1:1 при аэрации не более 500 мл/мин с освещением сверху (в режиме 12:12 день/ночь) и подачей свежей дезинфицированной морской воды. Через сутки и в течение последующих 10 сут производят сбор яиц, для чего ежедневно через каждые 12 часов отключают аэрацию и через 30 мин после ее отключения производят слив не менее 0.01 части общего объема морской воды. Яйца акарций собирают на сито, затем в течение 24 часов проводят инкубацию яиц акарций до выклева науплиев, из которых выращивают возрастные когорты акарций в течение 11-12 сут.

Ежедневное продуцирование яиц акарциями достигается оптимальными условиями содержания половозрелых самок и самцов при оптимальном соотношении полов и в наиболее производительном возрасте. Регулярный ежедневный сбор продуцируемых яиц и дальнейшее выращивание последовательных жизненных стадий от синхронного выклева науплиев обеспечивает регулярное и заранее рассчитанное получение массы когорты акарций определенного размера и количества.

Заявляемый способ соответствует критериям «новизна» и «технический уровень», т.к.:

- впервые предложены оптимальные температурные, трофические и плотностные условия для синхронизации и стандартизации процессов продуцирования яиц самками акарций, развития и выклева яиц, развития и роста молоди акарций до достижения половозрелой стадии;

5 - проведение дезинфекции яиц позволяет освободиться от патогенных микроорганизмов, влияющих как на выживаемость самих акарций, так и при использовании их в качестве живых кормов, на выживаемость личинок рыб;

- при данном способе культивирования акарций не происходит каннибализм старших копеподитных и взрослых стадий на младших науплиальных стадиях (т.е. не происходит 10 потери части популяции);

- предлагаемый способ когортных культур удобно применять для кормления личинок, т.к. нет необходимости многократного слива культуры акарций и деления ее на 15 стадии с помощью сит с разным размером ячеек, достаточно просто сконцентрировать на сито определенного размера заранее рассчитанный объем культуры определенного возраста;

- предлагаемый способ позволяет заранее осуществлять предварительную оценку количества и качества получаемых кормовых организмов;

- предлагаемый способ позволяет получать полноценные кормовые организмы (вместо коловраток - науплии акарций, вместо артемий - копеподитные стадии акарций);

20 - в отличие от используемых в интенсивной ларвiculture коловраток, получаемые предложенным способом кормовые организмы не создают избыточных концентраций пищи в выростных системах, не создают избыточных метаболитов, приводящих к повышению бактериального титра, не образуют поверхностной бактериальной пленки, препятствующей развитию личинок;

25 - получаемые кормовые организмы обеспечивают личинок морских рыб адекватным их потребностям незаменимыми компонентами (ненасыщенными жирными кислотами, аминокислотами и высокоэффективными каротиноидами с большой долей астаксантина); обеспечивают полноценное переваривание пищи в результате высокого содержания в копеподах экзоферментов и, как следствие, более раннее развитие у рыб 30 полноценной пищеварительной системы взрослого типа; повышают резистентность к стрессу; снижают до минимума аномалии скелетообразования и пигментации; обеспечивают правильный метаморфоз.

В течение жизненного цикла акарций проходят 6 науплиальных (личиночных, 35 обозначаемых N1-N6), 5 - копеподитных стадий (C1-C5) и одну, последнюю, 12-ю жизненную стадию - половозрелые акарции (самка или самец, обозначаемую C6♀ или

C6♂). Переход от одной стадии к другой осуществляется в результате морфологических и физиологических изменений, нарастания массы и размеров тела и смены покровов (линьки). После перехода (линьки) в стадию C6, акарций достигают терминальных 40 размеров тела, и линек больше не происходит. В дальнейшем может происходить только прирост биомассы акарций, например, за счет отложения запасных веществ и формирования генеративной продукции (яиц). Сроки достижения (прохождения очередной линьки) каждой последующей стадии акарций обусловлены эндогенными (запрограммированными генетически) механизмами процессов и зависят от комплекса 45 модифицирующих их температурных и трофических условий содержания организмов.

Способ реализуется следующим образом.

1) Выделение в культуру взрослых акарций (самцов и самок) (полученных из продезинфицированных яиц от самок из естественного планктона).

2) Содержание акарий в культуре при оптимальных температурных, трофических и гидрологических условиях в течение наиболее продуктивного периода и замена по истечении его новым поколением половозрелых копепод.

3) Процедура получения (и сбора) ежедневной стандартизированной продукции яиц акарий.

4) Инкубация яиц акарий до выклева науплиев.

5) Выращивание возрастных когорт акарий.

6) Сбор биомассы акарий определенной возрастной когорты для кормления личинок рыб определенного возраста.

Пример реализации способа

Предлагаемый способ интенсивного когортного культивирования акарий (морских каланоидных копепод) был успешно апробирован для кормления личинок камбалы калкан при выращивании их в пилотных установках ИМБИ, и мальки камбалы калкан, выращенные при применении данных копепод в качестве дополнительных кормов, не имели проблем с аномалиями пигментации и скелетообразования, которые обычно наблюдаются при кормлении личинок только солоноватоводными коловратками и артемиями.

Выделение в культуру взрослых акарий

Живых половозрелых самок и самцов *Acartia clausi* (или *Acartia tonsa*)

селекционировали из проб, собранных в прибрежных водах Севастопольской бухты Черного моря, выдерживали в дезинфекционном растворе, промывали стерилизованной морской водой и помещали в выростной бассейн, в который добавляли стерилизованную морскую воду с кормовыми микроводорослями, собранными из массовых культур в экспоненциальной фазе, и количество которых корректировали в соответствии с скоростью их выедания копеподами. Отложенные самками акарий яйца служили «маточным стадом» акарий, которые в дальнейшем служили для получения массовой культуры когортных возрастных групп акарий.

Содержание акарий в культуре и регулярное кормление

Для культивирования акарий применяли морскую воду соленостью $17.5 \pm 0.5\text{‰}$, к которой добавляли микроводоросли, служащие кормом копеподам. Оптимальная температура культивирования *Acartia clausi* - $21 \pm 1^\circ\text{C}$ (но возможно культивирование в температурном диапазоне $15\text{--}24^\circ\text{C}$), оптимум *Acartia tonsa* $24 \pm 2^\circ\text{C}$ (возможно содержание в температурном диапазоне $15\text{--}28^\circ\text{C}$). Постоянный уровень освещенности - 1000-3000 люкс на поверхности воды в инкубаторе, нижняя часть которого затемнена.

Плотность половозрелых акарий в цикле продуцирования яиц поддерживали в пределах не более 300 экз./л, а ежедневная подмена воды составляла не менее 1% общего объема среды. После чистки дна культиватора добавляли свежую стерильную морскую воду с одновременным добавлением свежих культур микроводорослей в экспоненциальной фазе развития.

Половозрелых копепод для оптимизации ежедневного продуцирования качественных яиц кормили смесью микроводорослей *Isochrysis galbana*, *Rhodomonas baltica*, *Prorocentrum minimum* в объемном соотношении культур 1:1:1. Искусственно выращенные микроводоросли используют в конце экспоненциальной фазы роста их культуры.

«Маточное стадо» акарий, состоявшее из половозрелых копепод в возрасте 11-12 суток (смесь самцов и самок в соотношении не менее 1: 4) при плотности не более 300 экз./л, помещали в емкость, снабженную мягкой продувкой воздухом (не более 500 мл/мин) с освещением сверху (в режиме 12:12 день:ночь) и подачей свежей воды.

Процедура получения ежедневной продукции (ежедневного сбора) яиц акарий

В процессе продукционного цикла ежедневно, лучше через каждые 12 часов, но не реже 1 раза в 24 часа, начиная с 8-9 часов утра, отключали аэрацию и через 30 мин после ее отключения путем резкого поворота сливного крана производили резкий слив 1% общего объема морской воды, который отфильтровали через газовое сито с ячейей 60 мкм. В результате позитивного фототаксиса взрослые акарии перемещались в верхний наиболее хорошо освещаемый слой воды, яйца акарий из-за высокой удельной плотности опускались вниз и, таким образом, при резком сливе нижней части объема на сите концентрировался преимущественно детрит и яйца акарий, свободные и прикрепленные к детритным частицам.

Суточная продукция яиц на взрослую особь (общее количество самцов и самок) в популяции акарий (при соотношении самка:самец около 4:1 в период в период наиболее активного репродуктивного периода самок, т.е. около 10-15 суток после начала репродукции) составляла в среднем 25 ± 4 в сутки при питании смесью монокультур микроводорослей при концентрации их биомассы $3 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$. Лаг-фаза между началом питания копепод и началом продуцирования яиц самками акарий составляла не более 24 часов. Время оптимальной эксплуатации маточного стада акарий (от момента получения первых яиц), т.е. период максимальной плодовитости самок, составлял от 14 до 30 сут в зависимости от вариаций температурного режима.

При содержании взрослых акарий в 1 м^3 при максимально возможной физиологически плотности акарий 300 экз./л, оптимальном кормлении и гидрологическом режиме и среднепопуляционной продукции яиц в сутки (при соотношении самцов к самкам не менее 1:4) 25 яиц, общая суточная продукция яиц акарий составляла около 7 млн.

Инкубация яиц акарий до выклева науплиев стадии N1.

Свежесобранные яйца копепод тщательно промывали дезинфекционным раствором, который затем смывали стерильной морской водой и подготавливали яйца для инокуляции в инкубационный бассейн со стерильной водой 18‰, в котором устанавливали на первые 12 час интенсивную аэрацию, создающую концентрацию кислорода не менее 85% насыщения и поддерживающую яйца акарий в толще воды. Над поверхностью поддерживали круглосуточное освещение, а температура воды составляла 20-22°C. В условиях оптимального содержания взрослых акарий, продуцировавших яйца, процент выклева жизнеспособных науплиев из свежесобранных яиц составлял 94-100%. Через 24 часа после начала инкубации из 7 млн свежесобранных яиц акарий получали выклев не менее 6.5 млн качественных науплиев стадии N1.

Выращивание возрастных когорт акарий

Науплии стадии N1 продолжали культивировать в том же объеме (для исходного количества - 6.5 млн науплиев стадии N1 необходимо их размещение в минимум 0.65 м^3 стерильной воды). Дальнейшее разбавление культуры производили путем добавления необходимого объема свежей стерильной морской воды (для снижения плотности копепод более старшего возраста) с одновременным добавлением необходимой концентрации смеси микроводорослей, состав которых изменяли по мере перехода копепод от одной жизненной стадии к другой. В результате предлагаемого интенсивного способа культивирования акарий получали следующие возрастные группы (когорты) акарий через определенные временные промежутки (табл. 1).

Таблица 1. Технологические характеристики получения когорт (возрастных стадий) акарий при культивировании в температурном режиме 20 – 22 °С

Стадия развития	Длина общая (µм)	Возраст (сут)	Максимальная плотность (экз/мл)	Корм (разные водорослей) (кл/мл)	виды
яйца	78±3	0	100	0	
науплий N1	100 ±1	1	5	10 ²	
науплий N2	128±3	1-2	2.5	10 ⁴	
науплий N3	155±5	2-3	1	10 ⁴	
науплий N4	186±5	3	0.5	5·10 ⁴	
науплий N5	215±6	4	0.25	5·10 ⁴	
науплий N6	260±6	5	0.1	5·10 ⁴	
копеподит C1	415±25	6	0.5	5·10 ⁴	
копеподит C2	500±105	7	0.3	5·10 ⁴	
копеподит C3	550±150	8	0.1	5·10 ⁴	
копеподит C4	675±175	9	0.05	5·10 ⁴	
копеподит C5	800±200	10	0.3	5·10 ⁴	
копеподит C6	925 - 1100	11	0.1 - 0.3	5·10 ⁴	

Микроводоросли, используемые для кормления копепод, необходимо корректировать как в количественном, так и в качественном (таксономический состав) соотношении в зависимости от стадии развития. Размер микроводорослей, которыми наиболее эффективно питаются (отфильтровывают) копеподы, находится в прямой пропорциональной зависимости от размера возрастной стадии копепод. Оптимальный размер и максимально возможный размер пищевых организмов, которые могут эффективно отфильтровывать и поглощать разные стадии акарий, возрастает от 7 мкм (10-14 мкм максимальный) для науплиальных стадий NII-NIII и до 14-70 мкм для взрослых стадий акарий (Bergreen et al., 1988).

При кормлении науплиальных стадий в кормовой смеси преобладали *Isochrysis galbana* и *Rhodomonas baltica* (1:1); при кормлении копепод на переходе от науплиальных к копеподитным - долю *Isochrysis galbana* снижали и добавляли *Prorocentrum minimum*, на поздних копеподитных стадиях постепенно увеличивая долю последнего вида микроводорослей в смеси *Rhodomonas baltica* и *Prorocentrum minimum* до соотношения

концентрации клеток 1:1.

При оптимальных условиях содержания выживаемость копепод от науплиальных стадий до достижения половозрелости составляет 75-95%, а минимальное время генерации - 10 ± 1 суток.

5 Через 11 сут после посадки на выращивание 6.5 млн науплиев при условии соблюдения оптимальных условий (концентрация кислорода не менее 85% насыщения, 20-22°C, и снижении плотности акарий по мере их роста и развития, от 5000 экз·л⁻¹ на стадии N2 до 300 экз·л⁻¹ на стадии поздних копеподитов (C5), ежедневная частичная подмена
10 чистой воды и поддержание концентрации вышеперечисленных кормовых

микроводорослей 3 мкг·мл⁻¹) количество взрослых акарий составит не менее 4.5 млн.

По истечении продукционного цикла яиц акарий (оптимум 15 суток при температуре 20-22°C) культиватор сливают, дезинфицируют, промывают и готовят к новому
15 продукционному циклу. Когорта половозрелых акарий (в возрасте 11-12 сут) может быть использована для дальнейшей эскалации культуры акарий (для производства яиц).

Таким образом, смена циклов производства акарий происходит приблизительно за период достижения когортой акарий половозрелости.

20 (57) Формула изобретения

Способ интенсивного когортного культивирования акарий (морских каланоидных копепод), включающий получение взрослых половозрелых особей из природных
условий, их выдерживание в дезинфицирующем растворе, отличающийся тем, что из
25 яиц от половозрелых копепод, в возрасте 11-12 суток (смесь самцов и самок в соотношении не менее 1:4), формируют маточное стадо акарий при плотности не более 300 экз./л, которых кормят смесью микроводорослей *Isochrysis galbana*, *Rhodomonas baltica*, *Prorocentrum minimum* в объемном соотношении культур 1:1:1 при аэрации не более 500 мл/мин с освещением сверху (в режиме 12:12 день/ночь), с регулярной
30 подменой свежей дезинфицированной морской воды, а через сутки и в течение последующих 10 суток производят сбор яиц, для чего ежедневно через каждые 12 часов отключают аэрацию и через 30 мин после ее отключения производят слив 0.01 части общего объема морской воды, собирая яйца акарий на сито, отмывая и дезинфицируя их, и затем в течение 24 часов проводят инкубацию яиц акарий до выклева науплиев, из которых выращивают возрастные когорты акарий.

35

40

45