

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A01K 61/00 (2019.08)

(21)(22) Заявка: 2019107325, 14.03.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
14.03.2019Дата регистрации:  
27.03.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 14.03.2019

(45) Опубликовано: 27.03.2020 Бюл. № 9

Адрес для переписки:

299011, Севастополь, пр. Нахимова, 2, ВРИО  
директора Федеральное государственное  
бюджетное учреждение науки Федеральный  
исследовательский центр "Институт биологии  
южных морей имени А.О. Ковалевского РАН",  
к.г.н. Р.В. Горбунову

(72) Автор(ы):

Ханайченко Антонина Николаевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Федеральный  
исследовательский центр "Институт  
биологии южных морей имени А.О.  
Ковалевского РАН" (ФИЦ ИнБЮМ) (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: SU 1768090 A1, 15.10.1992. UA 81055  
U, 25.06.2013. RU 2548106 C1, 10.04.2015.

(54) Способ получения живых кормов для личинок морских рыб

(57) Реферат:

Способ включает культивирование  
коловраток *Brachionus plicatilis* для использования  
в качестве живых кормов личинок рыб. За двое  
суток до использования коловраток в качестве  
корма их переводят на питание динофлагеллятами  
*Prorocentrum cordatum* и *Prorocentrum micans* приначальной концентрации микроводорослей в  
среде  $5 \times 10^4$  кл/мл. Способ обеспечивает  
получение живых кормов, имеющих высокое  
содержание докозагексаеновой и  
эйкозапентаеновой кислот. 1 табл., 1 пр.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC  
*A01K 61/00* (2019.08)

(21)(22) Application: **2019107325, 14.03.2019**

(24) Effective date for property rights:  
**14.03.2019**

Registration date:  
**27.03.2020**

Priority:

(22) Date of filing: **14.03.2019**

(45) Date of publication: **27.03.2020 Bull. № 9**

Mail address:

**299011, Sevastopol, pr. Nakhimova, 2, VRIO  
direktora Federalnoe gosudarstvennoe  
byudzhethoe uchrezhdenie nauki Federalnyj  
issledovatelskij tsentr "Institut biologii yuzhnykh  
morej imeni A.O. Kovalevskogo RAN", k.g.n. R.V.  
Gorbunovu**

(72) Inventor(s):

**Khanajchenko Antonina Nikolaevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethoe  
uchrezhdenie nauki Federalnyj issledovatelskij  
tsentr "Institut biologii yuzhnykh morej imeni  
A.O. Kovalevskogo RAN" (FITS InBYUM) (RU)**

(54) **METHOD FOR PRODUCTION OF LIVE FODDERS FOR SEA FISH LARVAE**

(57) Abstract:

FIELD: cattle breeding.

SUBSTANCE: method involves cultivation of rotifers *Brachionus plicatilis* for use as live fodders of fish larvae. Two days before usage of rotifers as fodder they are converted to nutrition with dinoflagellates *Prorocentrum cordatum* and *Prorocentrum micans* at

initial concentration of microalgae in medium of  $5 \times 10^4$  cells/ml.

EFFECT: method ensures production of live fodders having high content of docosahexanoic and eicosapentaenoic acids.

1 cl, 1 tbl, 1 ex

Изобретение относится к морскому рыбоводству, в частности к производству качественных живых кормов для личинок ценных морских рыб, и может быть использовано на рыбоводческих фермах.

Правильное развитие личинок ценных морских рыб (особенно, камбалообразных) невозможно без введения в их рацион кормовых организмов, адекватных пищевым потребностям морских рыб. Одним из наиболее важных параметров определения адекватности корма для личинок ценных морских рыб является содержание в нем незаменимых высоконасыщенных жирных кислот (ВНЖК) в определенной пропорции, нарушение которой вызывает отклонения в развитии рыб, вызывая аномалии развития пигментации и скелета, и снижает иммунитет и выживаемость рыб. Низкий уровень выживаемости личинок рыб может быть как результатом неадекватного потребностям личинок рыб биохимического состава коловраток, в частности, их липидного состава, в особенности содержания высоконасыщенных жирных кислот и их соотношения, так и неправильного формирования кишечной микрофлоры и высокой смертности в результате микробиальных проблем. В обоих случаях смертность связана с неадекватным состоянием кормовых организмов, которыми питаются личинки.

При использовании в аквакультуре стандартного способа интенсивной технологии выращивания личинок морских рыб в качестве незаменимых начальных живых кормов непременно используют солоноватоводных коловраток *Brachionus plicatilis* Muller, которые считаются высокотехнологичными, так как в оптимальных условиях интенсивного промышленного культивирования их можно выращивать при высокой скорости роста популяции и в отсутствии аутоингибирования при содержании в условиях высокой плотности (Ханайченко, 1988). Однако, солоноватоводные коловратки не способны к самостоятельному синтезу особенно важных для развития рыб незаменимых полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК)  $n-3$  : эйкозапентаеновой 20:5( $n-3$ ) (ЭПК) и докозагексаеновой кислоты 22:6( $n-3$ ) (ДГК), необходимых для повышения текучести клеточных мембран, и развития нормального зрения личинок рыб. Тем не менее содержание незаменимых компонентов в составе коловраток можно варьировать, насыщая их определенными питательными смесями, повышающими их питательную ценность для личинок рыб.

Для определения адекватности биохимического состава живых кормов биохимическим потребностям личинок рыб необходимо сопоставлять его с биохимическим составом кормовых организмов, которыми преимущественно питаются личинки рыб в естественных морских условиях. Таковыми являются морские каланоидные копеподы. В жирнокислотном составе морских каланоидных копепод разных видов ВНЖК варьируют в пределах 17-40% ДГК и 7-32% ЭПК от общего количества жирных кислот (Evjemo et al., 2003; van der Meeren et al., 2008; Karlsen et al., 2015). Искусственное выращивание морских каланоидных копепод возможно, но не в таких масштабах, как коловраток, так как для них необходимо высокое качество воды и низкая плотность посадки. Поэтому одним из основных параметров оценки адекватности коловраток потребностям личинок рыб после их насыщения является содержание в них ЭПК и ДГК, приближенное к таковому морских копепод. Для повышения качества коловраток и их соответствия пищевым потребностям личинок морских рыб, особенно камбалообразных, обычно производят предварительное насыщение коловраток перед внесением их в рыбоводные бассейны. Для насыщения коловраток используют либо микроводоросли, либо используют готовые промышленные стандартные насыщающие смеси. Содержание липидов и жирных кислот в коловратках определяют как состав их пищи, так и температурные условия.

Известен способ насыщения коловраток микроводорослями и снижения температуры выращивания коловраток (Ханайченко и др., 1988), наиболее близкий по осуществлению к заявляемому. При снижении температуры культивирования коловраток от 30 до 15°C и питании их микроводорослями *Platymonas viridis* содержание ПНЖК повышается с 0.3 до 0.8% сух.м, а при питании микроводорослями *Monochrysis galbana* - с 1.0 до 1.4% сух.м. (Ханайченко и др., 1988). Известны способы насыщения разными микроводорослями, в результате которого соотношение ДГК к ЭПК показывает тенденцию к его возрастанию у коловраток, питающихся *Tetraselmis suecica* - 0.05 (Lewis et al., 1998); *Nannochloropsis* - 0.06 (Lubzens et al., 1995; Kobayashi et al., 2008); *Pavlova lutheri* - 0.45 (Nichols et al., 1989); *Monochrysis lutheri* - 0.89; *Rhodomonas salina* - 1.2; *Isochrysis galbana* - 1.5 (Støttrup et al., 1995, в соответствии с возрастанием этого соотношения в составе микроводорослей. Применение при насыщении коловраток совместно обоих видов микроводорослей *R.salina* и *I.galbana* повышает выживаемость и рост личинок рыб (Støttrup et al., 1995). Самое высокое соотношение ДГК (5%) к ЭПК (1.7% от общих жирных кислот), равное 3, в составе коловраток достигалось при насыщении их микроводорослями *Isochrysis galbana*, выращиваемых в 40% проточном режиме (Ferreira et al., 2008).

Известны способы кратковременного (6-12 час) и длительного (16-24 час) насыщения коловраток промышленными эмульсиями (Dhert et al., 2001). Способ насыщения эмульсией с высоким содержанием липидов - HR приводит к повышению в составе коловраток содержания ЭПК и ДГК до 8.8 и 11.3% от жирных кислот, соответственно, при соотношении ДГК/ЭПК=1.3 (Reitan et al., 1994). Известен способ длительного насыщения промышленными липидными эмульсиями с наиболее высоким содержанием в липидах ДГК (DNA\_Super Selco), который приводит к повышению в составе коловраток соотношения ДГК к ЭПК до 1.8 (Lavens, Sorgeloos, 1996). Известен способ насыщения в течение 16 час эмульсиями ICES 30/0.6/C и ICES 30/4/C, в результате которого содержание ДГК в составе коловраток повышается до 11.7 и 17.0%, от общего содержания жирных кислот, а соотношение ДГК к ЭПК составляет 0.9 и 4.5, соответственно (Castel et al., 2003).

Известен способ использования для насыщения специализированной пасты Red Pepper (производство Bernaqua, Belgium), содержащей 28.6% ДГК от всех жирных кислот (Namre, 2016), при котором происходит наиболее активная аккумуляция ВНЖК, в результате насыщения которой соотношение ДГК к ЭПК составляет 3.5, однако доля их в жирнокислотном составе коловраток перед внесением личинкам невысока - 1.2 и 0.35%, соответственно (Egyalcin, 2018). Известно применение насыщающих смесей, разработанных (но ДСП) Bergen High Technology Centre, которые позволяют повысить содержание ЭПК до 7%, а ДГК до 19% от жирных кислот коловраток (Folkvord et al., 2018). Известен способ последовательного использования в течение более 24 часов нескольких насыщающих смесей, включающих пасту Red Pepper, что приводит к повышению содержания в коловратках в среднем ДГК - 20%, а ЭПК - 5% от общего содержания в коловратках жирных кислот (Namre, 2016).

Однако использование любых липидных эмульсий для насыщения коловраток приводит к быстрому загрязнению среды выращивания личинок рыб органическими отходами и, как следствие, к повышению титра нежелательных потенциально патогенных бактерий, и влечет за собой применение различных дезинфекционных мер, снижающих эффективность применения искусственных насыщающих смесей.

Задачей «Способа получения живых кормов для личинок морских рыб» является разработка технологии, обеспечивающей получение коловраток, имеющих высокое

содержание и соотношение ДГК к ЭПК, приближенное к таковому у морских каланоидных копепод, без применения искусственных химических эмульсий и смесей.

Технический результат от использования заявленного изобретения заключается в том, что применение предложенного кормления коловраток позволяет получить высокое содержание в них ценных незаменимых жирных кислот омега-3, аналогичному таковому у копепод; использование коловраток в качестве живых кормов позволяет улучшить качество питания личинок рыб, и улучшает правильное развитие их пигментного комплекса; внесение коловраток, насыщенных в соответствии с предлагаемым способом, позволяет замедлить их репродуктивную функцию и снижает количество яиц, продуцируемых самками (т.е. не происходит нежелательный рост численности популяции коловраток в системе выращивания личинок рыб).

Поставленная задача достигается путем аппроксимации жирнокислотного состава солоноватоводных коловраток к жирнокислотному составу морских каланоидных копепод. Для получения коловраток с высоким содержанием и соотношением ДГК к ЭПК на последнем этапе их культивирования за двое суток до использования в качестве живых кормов для личинок рыб, их переводят на кормление динофлагеллятами *Prorocentrum cordatum* и *Prorocentrum micans* (с содержанием 14.5% ДГК и 4.4% ЭПК (Nichols et al., 1984), при начальной концентрации микроводорослей в среде  $5 \times 10^4$  кл/мл.

Заявляемый способ соответствует критериям новизны и технический уровень, т.к.:  
- впервые предложены оптимальные трофические условия для получения продукции солоноватоводных коловраток *Brachionus plicatilis* с жирнокислотным составом, аппроксимированным к составу морских каланоидных копепод (акарций) без применения липидных насыщающих смесей;

- предлагаемый способ позволяет получать полноценные по жирнокислотному составу живые корма, используя интенсивный способ выращивания коловраток, вместо экстенсивного способа выращивания, применяемого при выращивании;

- получаемые кормовые организмы обеспечивают личинок морских рыб адекватными их потребностям незаменимыми ненасыщенными жирными кислотами, и, как следствие, обеспечивают формирование правильной пигментации личинок рыб;

- предлагаемый способ насыщения коловраток не приносит в систему выращивания нежелательных дополнительных метаболитов, что снижает бактериальную нагрузку на систему выращивания.

Известно, что среди микроводорослей разных таксонов наибольшее количество ВЖК с преобладанием ДГК над ЭПК содержится в динофлагеллятах (Zhukova, Aizdacher, 1995). Предварительно проведенные экспериментальные работы показали, что два вида нетоксичных динофлагеллят *P. cordatum* и *P. micans* активно потребляются живыми кормовыми организмами разного генезиса, используемыми при культивировании личинок камбалы калкан: солоноватоводными коловратками *Brachionus plicatilis*, морскими копеподами *Acartia tonsa* (Khanaichenko et al., 1998; Ханайченко и др., 2016) и метанауплиями артемий (Смирнов и др., 2019). Известно, что повышенного загрязнения среды отходами эмульсий и бактериального загрязнения от насыщенных коловраток можно избежать подбором для питания коловраток микроводорослями, которые, помимо улучшения жирнокислотного состава коловраток, дополнительно являются источником витаминов.

Способ реализуется следующим образом.

1) Культивирование массы коловраток партеногенетического клона *Brachionus plicatilis* производили в стандартных условиях при кормлении микроводорослями при

оптимальной температуре роста популяции  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ .

2) Кормление коловраток производили смесью микроводорослей, повышающих скорость роста их популяции.

3) За двое суток до использования коловраток в качестве корма для личинок рыб их сгущали, промывали и переводили на питание динофлагеллятами (при их начальной концентрации в среде  $5 \times 10^4$  кл/мл).

4) Перед кормлением личинкам рыб коловраток промывали дезинфицирующим раствором, и после вторичного промывания стерильной морской водой в сгущенном состоянии перемещали в темноту и температурные условия, снижающие метаболизм коловраток ( $\sim 10^\circ\text{C}$ ) до момента их внесения в выростные емкости с личинками рыб.

Пример реализации способа

Массовые культуры коловраток *Brachionus plicatilis* содержали в лабораторных условиях при кормлении микроводорослями на протяжении множественных генераций, поддерживая концентрацию микроводорослей в среде  $30 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ . Микроводоросли культивировали на стандартной среде Уолна, приготовленной на стерилизованной

18‰ черноморской воде. Температура, фотопериод и освещенность при культивировании микроводорослей и коловраток были идентичны:  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ; Свет : Темн = 12:12; 5000 люкс. За двое суток до использования коловраток в качестве корма для личинок рыб их сгущали, промывали, и переводили на питание динофлагеллятами при их начальной концентрации в среде  $5 \times 10^4$  кл/мл. После двухсуточного питания динофлагеллятами, коловраток промывали дезинфицирующим раствором, и вторично стерильной морской водой и в сгущенном состоянии перемещали в темноту и температурные условия, снижающие метаболизм коловраток ( $\sim 10^\circ\text{C}$ ) до начала кормления ими личинок.

В результате подобной процедуры насыщения коловраток по разработанной схеме на унифицированной диете, состоящей из динофлагеллят *Prorocentrum cordatum* и *Prorocentrum micans*, соотношение ДГК/ЭПК в составе коловраток возрастало до 3.2 и 3.8, что сопоставимо с содержанием ДГК и ЭПК в морских копеподах *Acartia tonsa* (Khanaychenko et al., 1998) и значительно превышает ДГК/ЭПК коловраток, получаемом при использовании большинства промышленных эмульгированных смесей SELCO. Общее содержание жирных кислот у коловраток, культивированных заявляемым способом, варьировало в пределах 30.2-34.7 мг МЭЖК,  $\text{г}^{-1}$  сухой массы. Питание динофлагеллятами *Prorocentrum* увеличивало содержание общих полиеновых жирных кислот, n-3 ВНЖК, ЭПК и ДГК (в составе ВНЖК, %) сопоставимых с копеподами (Таблица 1).

Таблица 1. Состав ПНЖК в липидах коловраток, выращенных с применением Способа

мг/г сух.м.	Brachionus/P.cordatum	Brachionus/P.micans	Brachionus/смесь P.cordatum+ P.micans
Общие липиды	59.9	87.2	132.1
ЭПК, мг/г сух.м.	1.2	1.3	2.5
ДГК, мг/г сух.м.	3.8	5.0	7.6
Жирные к-ты, %			
Насыщенные ЖК	34.2	27.6	32.1
ПНЖК	38.9	50.1	41.0
ЭПК 20:5(n-3)	3.4	4.3	3.9
ДГК 22:6(n-3)	10.9	16.4	12.0
n-3 ВНЖК	15.6	23.1	17.4
ДГК/ЭПК	3.2	3.8	3.0
(n-3)/(n-6)	5.8	8.8	7.4

#### Список литературы

1. Castell, J., Blair, T., Neil, S., Howes, K., Mercer, S., Reid, J., & Sorgeloos, P. (2003). The effect of different HUFA enrichment emulsions on the nutritional value of rotifers (*Brachionus plicatilis*) fed to larval haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Aquaculture International*, 11(1-2), 109-117.
2. Dhert, P., Rombaut, G., Suantika, G., & Sorgeloos, P. (2001). Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture*, 200(1-2), 129-146.
3. Dhont, J., Dierckens, K., Støttrup J., Van Stappen, G., Wille, M., & Sorgeloos, P. (2013). Rotifers, *Artemia* and copepods as live feeds for fish larvae in aquaculture. In Allan G, Burnell G (eds) *Advances in aquaculture hatchery technology* Woodhead Publishing, Cambridge, pp 157-202.
4. Eryalçın, K.M. (2018). Effects of different commercial feeds and enrichments on biochemical composition and fatty acid profile of rotifer (*Brachionus plicatilis*, Müller 1786) and *Artemia franciscana*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18(1), 81-90.
5. Evjemo, J.O., Reitan, K.I., Olsen, Y. (2003). Copepods as live food organisms in the larval rearing of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture*, 227(1-4), 191-210 DOI 10.1016/S0044-8486(03)00503-9.
6. Ferreira, M., Maseda, A., Fábregas, J., & Otero, A. (2008). Enriching rotifers with "premium" microalgae. *Isochrysis* aff. *galbana* clone T-ISO. *Aquaculture*, 279(1), 126-130.
7. Folkvord, A., Koedijk, R., Grahl-Nielsen, O., Meier, S., Rydland Olsen, B., Blom, G., ... Imsland, A.K. 2018. You are what you eat? Differences in lipid composition of cod larvae reared on natural zooplankton and enriched rotifers. *Aquaculture Nutrition*, 24(1), 224-235.
8. Hamre, K. 2016. Nutrient profiles of rotifers (*Brachionus* sp.) and rotifer diets from four different marine fish hatcheries. *Aquaculture*, 450, 136-142.
9. Karlsen, Ø., van der Meeren, T., Rønnestad, I., Mangor-Jensen, A., Galloway, T.F., Kjørsvik, E., Hamre, K. 2015. Copepods enhance nutritional status, growth and development in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae - can we identify the underlying factors?. *Peer J*, 3, e902.
10. Khanaychenko A.N., Dhert P., Van Ryckeghem K., Sorgeloos P. 1998. Evaluation of fatty acid composition of live feed fed Dinophyceae // *Aquaculture and Water: Fish Culture, Shellfish*

Culture and Water Usage. - Grizelth H., P. Kestemont (eds). EAS Spec. Publ. 26: 133-134

11. Kobayashi, T., Nagase, T., Hino, A., Takeuchi, T. 2008. Effect of combination feeding of *Nannochloropsis* and freshwater *Chlorella* on the fatty acid composition of rotifer *Brachionus plicatilis* in a continuous culture. *Fisheries science*, 74(3), 649-656.

12. Lavens, P., & Sorgeloos, P. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture (No. 361). Food and Agriculture Organization (FAO).

13. Lewis, T., Nichols, P.D., Hart, P.R., Nichols, D.S., & McMeekin, T.A. 1998. Enrichment of rotifers *Brachionus plicatilis* with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid produced by bacteria. *Journal of the World Aquaculture Society*, 29(3), 313-318

14. Lubzens, E., Gibson, O., Zmora, O., Sukenik, A. (1995). Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis* sp.) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. *Aquaculture*, 133(3-4), 295-309.

15. Nichols, P.D., Holdsworth, D.G., Volkman, J.K., Daintith, M., Allanson, S. 1989. High incorporation of essential fatty acids by the rotifer *Brachionus plicatilis* fed on the Prymnesiophyte alga *Pavlova lutheri*. *Marine and Freshwater Research*, 40(6), 645-655.

16. Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R., & Olsen, Y. 1994. Influence of lipid composition of live feed on growth, survival and pigmentation of turbot larvae. *Aquaculture International*, 2(1), 33-48.

17. Støttrup, J.G., Gravningen, K., & Norsker, N.H. 1995. The role of different algae in the growth and survival of turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.) in intensive rearing systems. In *ICES Marine Science Symposia Vol. 201*, pp. 173-186.

18. van der Meeren T, Olsen RE, Hamre K, Fyhn HJ. 2008. Biochemical composition of copepods for evaluation of feed quality in production of juvenile marine fish. *Aquaculture* 274: 375-397 DOI 10.1016/j.aquaculture.2007.11.041.

19. Zhukova NV, Aizdaicher NA 1995. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry* 39:351-356.

20. Смирнов Д.Ю., Аганесова Л.О., Ханайченко А.Н. 2019. Влияние микроводорослей как кормовых объектов на размерные характеристики и выживаемость науплиусов крымских артемий *Artemia* spp. (Branchiopoda: Anostraca). *Морской биологический журнал* (в печати).

21. Ханайченко А.Н., 1988. Питание и продуцирование коловраток в экспериментальных популяциях при комбинированном воздействии температуры и трофических условий (на примере *Brachionus plicatilis* Muller, 1786). Канд. Дисс. Минск/Севастополь, 159 С.

#### (57) Формула изобретения

Способ получения живых кормов для личинок морских рыб из коловраток *Brachionus plicatilis*, характеризующийся тем, что за двое суток до использования коловраток в качестве корма их переводят на питание динофлагеллятами *Prorocentrum cordatum* и *Prorocentrum micans* при их начальной концентрации в среде  $5 \times 10^4$  кл/мл.