

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
A01K 61/20 (2022.08)

(21)(22) Заявка: 2022117114, 23.06.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
23.06.2022Дата регистрации:  
23.01.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 23.06.2022

(45) Опубликовано: 23.01.2023 Бюл. № 3

Адрес для переписки:

299011, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2,  
ФГБУН ФИЦ "Институт биологии южных  
морей имени А.О. Ковалевского РАН", отдел  
охраны интеллектуальной собственности

(72) Автор(ы):

Ханайченко Антонина Николаевна (RU),  
Аганесова Лариса Олеговна (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: RU 2541458 C1, 10.02.2015. RU  
2614644 C1, 28.03.2017. ХАНАЙЧЕНКО А.Н.  
и др. "Селективность питания конепод разных  
экологических групп микроводорослями";  
Сборник материалов Всесоюзной научно-  
практической конференции с международным  
участием "Морские биологические  
 достижения и перспективы", 2016, т.1, с. 323-  
326. RODRIGO ALMEDA et al. "Effect of (см.  
прод.)

## (54) СПОСОБ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МОРСКИХ ЦИКЛОПОИДНЫХ КОПЕПОД OITHONA DAVISAE

## (57) Реферат:

Изобретение относится к области морской аквакультуры. Заявлен способ культивирования морских циклопоидных копепод *Oithona daviseae*, включающий получение исходных взрослых особей ойтон из планктонных проб, отобранных из моря, дезинфекцию и адаптирование к условиям культивирования; затем половозрелых самок ойтон содержат на протяжении 4 сут в культиваторе со стерилизованной морской водой при плотности 0.1 экз./мл при ежедневном кормлении нанопланктонными микроводорослями в концентрации  $10^4$ - $10^5$  кл/мл; через 12 ч после массового выклева науплиев отделяют от самок и культивируют 12 сут в стерильной морской воде, постепенно снижая плотность копепод от 5 экз./мл до 0.1 экз./мл до достижения половозрелости одновозрастной

когорты с ежедневной коррекцией концентрации микроводорослей до уровня  $5 \times 10^4$  кл./мл; затем в течение 2 сут стимулируют оплодотворение самок самцами, сокращая достигнутый культивационный объем путем снижения температуры до 15°C, светового дня до 5 ч и концентрации микроводорослей до  $10^3$  кл/мл, затем снижают температуру до 10°C; самок в контейнерах со стерильной морской водой с небольшой концентрацией пищи помещают в холодильную установку при  $7 \pm 1$ °C в полную темноту, где содержат 2-4 месяца с еженедельной очисткой контейнеров, заменой 50% среды с добавлением  $10^3$  кл./мл микроводорослей; а за 4 сут до даты начала перехода на внешнее питание культивируемых личинок морских рыб у

C1  
2 3 5 8 8 5 3 2  
RUR U  
2 7 8 8 5 3 2  
C 1

R U 2 7 8 8 5 3 2 C 1

гибернирующих самок ойтон поднимают температуру до 17°C, промывая стерильным раствором, кормят смесью микроводорослей с добавлением гетеротрофной динофлагелляты *Oxyrrhls* и переносят в емкости для личинок, в которые продолжают добавлять микроводоросли. Изобретение обеспечивает получение кормового продукта соответствующего размера для перехода личинок рыб с пелагической икрой на внешнее питание. 5 ил., 1 табл., 1 пр.

гидробиологических инвазий, 2018, N 4, с.17-30.

(56) (продолжение):

temperature and food concentration on the survival, development and growth rates of naupliar stages *Oithona davisae* (Copepoda, Cyclopoida); Marine ecology progress series, 2010, v.410, p.97-109. ДРАГУН И.Е., ХАНАЙЧЕНКО А.Н. "Морфология науплиусов и длительность науплиального развития черноморского вселенца *Oithona davisae* Ferrari and Orsi, 1984, (Copepoda:Cyclopoida) в условиях лабораторной культуры"; Российский журнал биологических инвазий, 2018, N 4, с.17-30.

R U 2 7 8 8 5 3 2 C 1

FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

## (12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC  
A01K 61/20 (2022.08)

(21)(22) Application: 2022117114, 23.06.2022

(24) Effective date for property rights:  
23.06.2022Registration date:  
23.01.2023

Priority:

(22) Date of filing: 23.06.2022

(45) Date of publication: 23.01.2023 Bull. № 3

Mail address:  
299011, g. Sevastopol, pr. Nakhimova, 2, FGBUN  
FITS "Institut biologii yuzhnykh morej imeni A.O.  
Kovalevskogo RAN", otdel okhrany intellektualnoj  
sobstvennosti

(72) Inventor(s):

Khanaichenko Antonina Nikolaevna (RU),  
Aganessova Larisa Olegovna (RU)

(73) Proprietor(s):

Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe  
uchrezhdenie nauki Federalnyj issledovatelskij  
tsentr "Institut biologii yuzhnykh morej imeni  
A.O. Kovalevskogo RAN" (FITS InBYUM) (RU)C1  
2  
3  
5  
8  
8  
27  
2  
RUR  
U  
2  
7  
8  
8  
5  
3  
2  
C1

## (54) METHOD FOR CULTIVATION OF OITHONA DAVISAE MARINE CYCLOPOID COPEPODS

(57) Abstract:

FIELD: marine aquaculture.

SUBSTANCE: method for cultivation of *Oithona davisae* marine cyclopoid copepods is claimed, including obtainment of initial adult oithon specimens from plankton samples selected from the sea, disinfection, and adaptation to cultivation conditions. Then, mature oithon females are contained for 4 days in a cultivator with sterilized seawater with a density of 0.1 pieces/ml, with daily feeding with nano-plankton microalgae in a concentration of  $10^4$ - $10^5$  c/ml. 12 hours after mass hatching, nauplii are separated from females and cultivated for 12 days in sterile seawater, gradually reducing a copepod density from 5 pieces/ml to 0.1 pieces/ml until reaching maturity of the same-age cohort, with daily correction of the concentration of microalgae to a level of  $5 \times 10^4$  c/ml. Then, fertilization of females by males is stimulated during 2 days, reducing a reached cultivation volume by reduction in a temperature to 15°C, daylight to 5 h, and concentration

of microalgae to  $10^3$  c/ml, then, a temperature is reduced to 10°C. Females in containers with sterile seawater, with a small concentration of food, are placed in a refrigeration installation at  $7 \pm 1$ °C, in complete darkness, where they are contained for 2-4 months with weekly purification of containers, replacement of 50% of the medium, with addition of  $10^3$  c/ml of microalgae. 4 days before the beginning of transition to external feeding of cultivated larvae of marine fish, in hibernating oithon females, a temperature is increased to 17°C, washing with a sterile solution, they are fed with a mixture of microalgae with addition of heterotrophic *Oxyrrhls* dinoflagellate and transferred to containers for larvae, to which microalgae is continued to be added.

EFFECT: invention provides obtainment of a feed product of a corresponding size for transition of fish larvae with pelagic caviar to external feeding.

1 cl, 5 dwg, 1 tbl, 1 ex

Изобретение относится к области морской аквакультуры и предназначено для получения массы живых организмов для использования в качестве стартовых мелкоразмерных живых кормов, для питания ранних пелагических личинок ценных морских рыб, и может быть использовано на рыбоводческих питомниках, в аквакультуре 5 ранних стадий развития ценных морских рыб, в морской аквариумистике, а также для проведения экспериментальных научно-исследовательских работ в области биологии, эмбриологии, генетики, физиологии, биохимии и биологического тестирования.

Пелагические личинки морских рыб являются активными хищниками, и в течение длительного периода после выклева (до возраста ~ 25-40 сут) не могут потреблять 10 инертные корма, но питаются исключительно живыми кормовыми планктонными организмами. Выживаемость и дальнейшее развитие ранних личинок ценных пород морских рыб с пелагической икрой обусловлена их своевременным переходом на внешнее питание адекватными стартовыми кормами необходимого размера, соответствующими размерам их рта и поведенческим характеристикам, особенно на 15 ранних этапах в короткий период перехода от эндогенного к экзогенному питанию. Трудность заключается в том, что маленькие ранние личинки рыб (~3-4 мм) в период перехода на внешнее питание имеют отрицательный энергетический баланс при небольших запасах желточного мешка и жировой капли и нуждаются в своевременном питании исключительно мелкоразмерными живыми кормами наиболее доступного 20 размера (80-180 мкм), соответствующими их этологическим (ограниченная функциональность зрительного, ротового и двигательного аппаратов) характеристикам (Ханайченко, Гирагосов, 2021).

В противном случае, у личинок иссякают запасы энергии, которые они получили с запасами икры (желтка и жировой капли) и возникают аномалии в эпителии желудочно- 25 кишечного тракта, что приводит либо к заниженным выживаемости и скорости роста личинок, либо к точке невозврата и гибели личинок.

При выращивании личинок морских рыб по интенсивной технологии в качестве начальных живых кормов при переходе на внешнее питание часто используют солоноватоводных коловраток *Brachionus plicatilis* Muller, которые считаются 30 высокотехнологичными, так как в оптимальных условиях интенсивного промышленного культивирования их можно выращивать при высокой скорости роста популяции и в отсутствии аутоингибиции при содержании в условиях высокой плотности (Ханайченко, 1988). Однако, переход на внешнее питание личинок при использовании первых живых кормов коловраток не всегда успешен, так как размер, жирнокислотный 35 и аминокислотный состав солоноватоводных коловраток не соответствуют потребностям ранних личинок ценных пород морских рыб с пелагической икрой. Этим потребностям в большей степени соответствуют морские копеподы, для некоторых видов которых разработаны способы культивирования в контролируемых искусственных условиях.

Известен способ получения высококачественных кормовых организмов «Способ 40 культивирования каланоидных копепод *Calanus euxinus* (черноморского калянуса)» - вида наиболее крупных каланоидных копепод низкотемпературного глубоководного комплекса Черного моря (Пат. 2541458, РФ, МПК A01K 61/00, 2014). Он включает выделение диких самок калянуса из зоопланктонных ловов, содержание их в условиях 45 культивирования, 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), и требует больших и глубоких бассейнов с большим объемом воды, что затрудняет быстрое получение массового количества

5 необходимых стадий копепод. Несмотря на то, что науплии калянуса - высококачественный корм - использовать их для перевода личинок рыб на внешнее питание достаточно трудоемко и времязатратно; выращивание их требует длительного периода времени и больших объемов, и самые ранние науплии слишком крупны для перехода на внешнее питание ранних личинок рыб с пелагической икрой.

10 Известны способы получения других морских каланоидных копепод - акарций «Способ интенсивного когортного культивирования акарций (морских каланоидных копепод)» (Пат. 2614644, РФ, МПК A01K 61/00, 2015) и его дополнение «Способ длительного хранения покоящихся яиц копепод акарций для получения массовой синхронной культуры одновозрастных науплиев» (Пат.2670159, РФ, МПК A01K 61/00, 15 2017). Однако, несмотря на то, что в возрасте 5 сут (во время этапа смешанного питания) науплии акарций являются более подходящим кормовым организмом по сравнению с коловратками как по размерным характеристикам, так и с точки зрения биохимической адекватности (Meeren et al., 2008), ранние личинки калкана из смеси кормовых объектов избирают более медленно передвигающихся жертв (коловраток), игнорируя более 20 быстрых науплиев акарций (Ханайченко, Битюкова, 1999).

Для максимальной выживаемости ранних личинок морских рыб с пелагической икрой необходима их высокая обеспеченность мелкоразмерными живыми кормами как в море, так и в искусственных условиях аквакультуры. В естественных условиях Черного моря в 1970-х годах самыми мелкоразмерными пищевыми объектами ранних 25 личинок рыб являлись циклопоидные копеподы *Oithona nana*, которые в результате вспышки гребневиков *Mnemiopsis leyidii* были элиминированы к 1989 г. полностью, что привело к голоданию более 50% ранних личинок рыб и, соответственно, к их высокой смертности. В начале 2000-х эндемик Японского моря мелкоразмерная циклопоидная копепода *Oithona davisae* Ferrari and Orsi 1984 (далее по тексту ойтона) была внесена с 30 балластными водами в Черное море и, заняв экологическую нишу черноморских циклопоидных копепод *O. nana*, стала к 2005 г. постоянным резидентом и времененным доминантным (в летне-осенне время в планктонном сообществе копепод) видом в течение 2008-2015 гг. (Губанова и др., 2019), достигая по численности (всех жизненных 35 стадий, в том числе науплиев ~ 90%) 1 млн. экз. в  $\text{m}^3$  (Серёгин, Попова, 2016). После этого в прибрежных акваториях Черного моря наблюдался положительный тренд среднегодовой численности и выживаемости наиболее ранних личинок рыб с пелагической икрой, очевидно связанный с улучшением их кормовой базы в связи с возрастанием численности в планктоне копепод *O. davisae* (Губанова и др., 2019) и 40 положительная связь между обилием ойтоны в зоопланктоне и ее долей среди пищевых объектов личинок рыб на ранних стадиях развития (Vdodovich et al., 2017).

Благодаря мелким размерам и высокой концентрации в море ойтона оказывается наиболее доступным мелкоразмерным кормом для личинок рыб. Не только науплиальные стадии *O. davisae* (NI-N6, длиной от 75 до 178 мкм) (Драпун, Ханайченко, 45 2018) благодаря своим размерным и поведенческим характеристикам удовлетворяют потребностям ранних личинок морских рыб с пелагической икрой, но и более старшие стадии этих копепод потребляются в большом количестве поздними личинками. Высокие индексы наполнения кишечников ранних личинок рыб в море копеподами *O. davisae* в период их массового развития (Vdodovich et al., 2017) обусловливают перспективность

культивирования ойтон в качестве живого корма для эффективного раннего перевода на внешнее питание личинок ценных морских рыб, включая калкана.

Задачей Способа культивирования морских циклопоидных копепод *Oithona davisae* является разработка технологии культивирования искусственных моновидовых популяций данного вида копепод.

Технический результат от решения поставленной задачи заключается в том, что сочетание технических приемов позволяет управлять составом искусственной популяции ойтон: получать в оптимальных условиях массу половозрелых особей обоих полов, создавать условия для оплодотворения самок самцами, переводить оплодотворенных самок в состояние квази-паузы, поддерживать условия для их жизнеспособности в состоянии пониженного метаболизма в условиях длительной гибернации, создавать оптимальные условия активации повышения метаболизма и производства самками жизнеспособных яиц для получения массы мелкоразмерных науплиальных и последующих стадий развития ойтоны в запрограммированные сроки для кормления ранних личинок рыб на стадии перехода на внешнее питание и на более старших стадиях.

Заявленный технический результат достигается тем, в Способе культивирования морских циклопоидных копепод *Oithona davisae*, включающем получение исходных взрослых особей ойтон из планктонных проб, отобранных из моря, выдерживание в дезинфицирующем растворе, адаптацию к условиям культивирования, половозрелых самок ойтон содержат на протяжении 4 суток в культиваторе со стерилизованной морской водой при плотности ~ 0.1 экз/мл при ежедневном кормлении нанопланктонными микроводорослями *Prasinophyceae Tetraselmis suecica and Cryptophyceae Rhodomonas storeatuloformis* при концентрации  $10^4\text{-}10^5$  кл/мл. Через 12 часов после массового выклева науплиев отделяют от самок и культивируют в течение 12 сут в стерильной морской воде, увеличивая объем культивирования путем добавления среды, постепенно снижая плотность копепод от 5 экз/мл до 0.1 экз/мл с переходом от стадии к стадии, вплоть до момента достижения половозрелости одновозрастной когорты, с ежедневной коррекцией концентрации микроводорослей, поддерживая ее

на уровне в среднем  $5\times10^4$  кл/мл. Затем в течение 2 суток стимулируют оплодотворение самок самцами, постепенно сокращая достигнутый культивационный объем путем снижения температуры до 15°C и светового дня до 5 часов и концентрации микроводорослей до  $10^3$  кл/мл. После этого вводят оплодотворенных самок ойтон в состояние гибернации снижением температуры до 10°C. Далее самок в контейнерах, наполненных стерильной морской водой с небольшой концентрацией пищи, помещают в холодильную установку при температуре 7±1°C в полную темноту, где содержат 2-4 месяца в условиях гибернации, еженедельно производя очистку контейнеров и подмену 50% среды, заменяя стерильной морской водой с добавлением  $10^3$  кл/мл микроводорослей. За 4 сут до даты начала перехода на внешнее питание культивируемых личинок морских рыб, у гиберирующих самок ойтон постепенно поднимают температуру до 17°C, промывая стерильным раствором, кормят их смесью микроводорослей с добавлением гетеротрофной динофлагелляты *Oxyrrhis* и переносят в емкости для личинок, в которые продолжают добавлять микроводоросли.

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

- впервые предложен оптимальный кормовой объект для перевода на внешнее питание самых ранних мелких личинок рыб с пелагической икрой;
- размерные и поведенческие характеристики науплиальных стадий копепод *O.davisae* полностью соответствуют размерным характеристикам рта и этологическим

особенностям ранних личинок ценных морских рыб с мелкой пелагической икрой (калкан, тюрбо, *Scophthalmus maximus*, сибас, *Dicentrarchus labrax*, султанка, *Mullus barbatus*, пр.);

- применение предложенного способа получения массы науплиев копепод *O. davisae*

5 позволяет за короткий срок получать количество кормовых организмов соответствующего размера для перехода личинок рыб на внешнее питание;

- использование науплиев *O. davisae* в качестве живых кормов позволяет повысить процент успешного перехода на внешнее питание и, соответственно, выживаемость личинок ценных морских рыб в искусственных условиях;

10 - при условии неполного выедания науплиев *O. davisae* на стадии перехода на внешнее питание, копеподы развиваются в системе выращивания до копеподитных и взрослых стадий параллельно с развитием личинок рыб и служат им дополнительным эффективным живым кормом;

- предлагаемые для кормления личинок рыб копеподы *O. davisae* на всех стадиях

15 развития не только не привносят в систему выращивания нежелательных дополнительных метаболитов (как, например, солоноватоводные коловратки *B. plicatilis*), снижая бактериальную нагрузку на систему выращивания, но и являются фактором, снижающим вероятность развития нежелательных инфузорий в системе выращивания, так как ойтоны являются хищниками по отношению к свободно живущим инфузориям,

20 и быстро элиминируют их в среде выращивания;

- предлагаемые для кормления личинок рыб копеподы *O. davisae* позволяет применять их в широком диапазоне солености (12-40‰) и температур (15-28°C) в пределах толерантности данного вида копепод (Svetlichny et al., 2016);

25 - дополнительными преимуществами предлагаемого способа получения *O. davisae* является высокая чувствительность этих копепод к различного рода поллютантам (Saiz et al., 2009), и, таким образом, они могут служить индикатором возможного загрязнения морской среды, нежелательного при выращивании личинок рыб в условиях марикультуры.

Способ поясняется описанием, таблицей (Табл. 1), и иллюстрациями, представленными 30 на Фиг. 1-Фиг. 4:

Таблица 1 - Последовательность изменения объема культивационной среды и плотности когорт ойтон до достижения ими половозрелости;

Фиг. 1 - Ойтона под бинокуляром;

Фиг.2 - Изменение цветности культуры криптофитовых микроводорослей *R.*

35 *storeatuliformis* от светло-желтой до интенсивной светло-коричневой окраски в течение экспоненциального роста (при возрастании концентрации клеток в 0.5 л колбах - слева направо) (из Khanaychenko et al., 2022), используемых для кормления ойтон в условиях культивирования;

40 Фиг. 3 - Фото половозрелых особей копепод *O. davisae* из культуры, выращенной в лабораторных условиях: 1) самец TL ~ 0.52 мм 2) оплодотворенная самка (TL ~ 0.56 мм) и самка с яйцевыми мешками (TL ~ 0.57 мм);

Фиг. 4 - Фото науплиев N2-N5, полученных в течение 3-5 суток от самки *O. davisae* после ее перемещения из режима гибернации в оптимальные условия;

45 Фиг. 5 - Копеподы *O. davisae* из кишечников личинок черноморских рыб, находящиеся в разной степени переваренности (из Vdodovich et al., 2017).

Способ культивирования *O. davisae* в качестве живых начальных кормов для личинок рыб не описан. Некоторые особенности биологии *O. davisae* были изучены на лабораторных популяциях. Показано, что *O. davisae* может питаться разнообразными

микроводорослями, однако, наиболее высокие скорости потребления ее наутилальными и взрослыми стадиями были определены при питании небольшими планктонными инфузориями и гетеротрофными динофлагеллятами *Oxyrrhis* (Saiz et al., 2014). Поэтому основные биологические параметры данного вида копепод были ранее получены при питании *Oxyrrhis*. Скорость роста и развития наутилиев ойтон возрастает в зависимости от количества потребленной пищи и температуры до 28°C (Almeda et al., 2010). Максимальная скорость потребления пищи (*Oxyrrhis marina*) самками *O. davisae* составила 80% углеродного эквивалента массы их тела (Zamora-Terol, Saiz, 2013).

Несмотря на то, что ойтона является теплолюбивым организмом и температурный диапазон функционирования ее популяции находится в пределах 10-30°C, а оптимум развития от 18 до 28°C, благодаря уникальной жизненной стратегии этот вид копепод выживает и в холодный период в условиях Черного моря. Результаты собственных исследований показали, что стратегия выживания популяции ойтон в большом диапазоне температур заключается в сочетании уникальных биологических особенностей данного вида копепод, а именно:

- 1) Способность самок ойтон после единственного оплодотворения одним самцом сохранять сперму в сперматеке в течение всего жизненного цикла;
- 2) Способность производить оплодотворенные яйца и жизнеспособных наутилиев после единственного оплодотворения на протяжении всего репродуктивного периода;
- 3) Способность самок сохранять жизнеспособность и живую сперму в сперматеках в условиях гибернации (снижения температуры воды до 6-7°C) в состоянии квази-диапаузы (пониженной метаболической активности) длительностью до 4 мес. с незначительной смертностью, не превышающей  $0.006 \text{ сут}^{-1}$ ;
- 4) Способность самок производить жизнеспособное потомство (яйца и наутилиев) после перехода из условий гибернации в благоприятные, оптимальные для воспроизведения условия;
- 5) Экономный расход энергетических запасов пищи и биологического материала в процессе спаривания, выживания, размножения, роста и развития потомства.

Наши экспериментальные исследования показали, что самки *O.davisae* обладают способностью выживать при низких температурах (6-8°C) на протяжении нескольких месяцев в состоянии пониженного метаболизма (в состоянии квази-диапаузы), сохраняя жизнеспособность спермы в сперматеках после единственной копуляции, и после наступления оптимальных температуры (начиная с 16°C) и трофических условий выходить из квази-диапаузы и производить жизнеспособное потомство (Svetlichny et al., 2016). При питании самки *O.davisae* проявляют ярко выраженную селективность (до +0.7) по отношению к подвижным нанопланктонным жгутиковым, в частности, к криптофитовым микроводорослям (6-20 мкм), суточное потребление которых может превышать 150% от углеродного эквивалента массы самок *O.davisae* (Khanaychenko et al., 2018) и стимулирует массовое производство наутилиев, которые вырастают от  $81 \pm 3$  мкм на первой наутилальной стадии (N1) до  $171 \pm 6$  мкм на шестой стадии (NVI) (Драпун, Ханайченко, 2018). Пример реализации способа.

Для получения исходной культуры ойтон производили выделение интактных половозрелых особей ойтон из живых планктонных проб из моря:

- 1) Производили их дезинфекцию и адаптировали их к условиям культуры: дезинфицированная морская вода при температуре  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  и питание нанопланктонными микроводорослями, при их предварительном содержании в культиваторах при плотности ~ 0.1 экз/мл;
- 2) Помещали их в трофические и температурные условия, способствующие

оплодотворению самок самцами: адаптированных к условиям культивирования половозрелых ойтон аккуратно концентрируют с помощью нейлонового сита с размером отверстий 150 мкм и переносят в новый культиватор наполненный стерилизованной морской водой при плотности ~ 0.1 экз/мл, где производят их ежедневное кормление 5 нанопланктонными микроводорослями *Prasinophyceae T. suecica* and *Cryptophyceae Rh. storeatuloformis* при концентрации  $10^4$ - $10^5$  кл/мл;

3) Получали от самок потомство (науплиев) на протяжении 4 суток, из которых в течение первых двух суток у самок созревают ооциты, а затем в их яйцевых мешках откладываются оплодотворенные яйца, в которых в течение 2 суток созревают эмбрионы 10 и затем из яиц происходит выклев науплиев;

4) В течение 12 часов после массового выклева науплиев, последних отделяли от самок с помощью сита с размером отверстий 100 мкм и культивировали в виде одновозрастной когорты ойтон;

5) Полученную массовую искусственную моновидовую популяцию ойтон 15 подращивали в течение 12 суток (при ежедневной коррекции концентрации микроводорослей) при последовательном разбавлении среды и, соответственно, снижении плотности организмов с 5 до 0.1 экз/мл по мере развития копепод (Табл. 1) от науплиев N1~ 75-80 мкм до N6=135-178 мкм и далее от копеподитных стадий С1 до С5 и до перехода к половозрелости, до популяции, состоящей из одновозрастной 20 когорты половозрелых самцов и самок: самок (С6 ♀) с общей длиной ~550 мкм и самцов (С6 ♂) с общей длиной ~520 мкм;

6) Стимулировали оплодотворение самок самцами в течение 2 суток, производя снижение температуры до 15°C, светового дня до 5 час, концентрации микроводорослей 25 до  $10^3$  кл/мл, и культивационного объема в 5 раз с помощью обратной фильтрации через сито 150 мкм;

7) Производили контроль осемененности самок, и вводили оплодотворенных самок ойтон в состояние гибернации снижением температуры до 10°C, и перемещали самок в контейнерах, наполненных стерильной морской водой с небольшой концентрацией 30 пищи, в холодильную установку при температуре 7±1°C в полную темноту;

8) При содержании оплодотворенных гиберирующих самок в состоянии квазидиапаузы на протяжении от 2-х до максимум 4-х месяцев в холодильных установках при 6-8°C еженедельно производили очистку контейнеров и подмену до 50% старой 35 среды путем обратной фильтрации через 150 мкм сито и замену ее стерильной морской водой с добавлением  $10^3$  кл/мл микроводорослей;

9) За 4 суток до известной даты начала перехода на внешнее питание культивируемых личинок морских рыб гиберирующих самок ойтон выдерживали в стерильной среде несколько часов, постепенно поднимая температуру до 17°C, и кормлении смесью микроводорослей с добавлением гетеротрофных динофлагеллят *O. marina* и переносили 40 в емкости для личинок, в которые продолжали добавлять микроводоросли;

10) Через 2 суток после их перемещения в оптимальные для размножения условия самки в отсутствие самцов формировали оплодотворенные яйца, из которых непосредственно в емкостях культивирования личинок рыб через 2 суток выклевывались науплии N1 размером ~80 мкм, выраставшие за 3-4 суток до ~180 мкм;

45 11) На протяжении 10-15 последующих суток (то есть до начала метаморфоза у личинок рыб) самки ойтон продуцировали каждая ~ 60 яиц с ~90% выклевом жизнеспособных науплиев N1;

12) Несъеденные личинками рыб ойтоны, развиваясь в копеподиты, служили

высококачественным кормом для повзрослевших личинок рыб, а также выедали в бассейне любой нежелательно развивающийся микропланктон.

Подобранные нами трофические условия для культивирования *O. davisae* являются более оптимальными для роста и развития науплиальных стадий по сравнению с

<sup>5</sup> применявшимися ранее, описанными в литературе. При питании криптофитовыми *R. storeatuloformis* (Khanaychenko et al., 2022) при стандартной температуре (20°C) в условиях лабораторной культуры науплиальный период *O. davisae* (N1-C1) был короче ( $5.3 \pm 0.7$  сут), чем при питании гетеротрофной динофлагеллятой *Oxyrrhis* - 6.3-7.03 сут (Almeda et al., 2010); либо смесью зеленых водорослей - 7-9 сут (Uchima, 1979). Замедление  
<sup>10</sup> развития, очевидно, связано с неадекватностью питания, особенно на поздних науплиальных стадиях N5-N6, что подтверждается большими длинами этих стадий (N5- 138-155 мкм и N6-163-178 мкм) при питании криптофитовыми (Драпун, Ханайченко, 2018) по сравнению с *O. davisae*, питавшимися *Oxyrrhis* (N5-116 - 132 мкм и N6-154-164 мкм) (Almeda et al., 2010) или зелеными микроводорослями (N5-125-135 мкм и N6- 135-  
<sup>15</sup> 160 мкм) (Uchima, 1979);

13) При переносе гибернировавших самок ойтон в культивационные емкости для личинок при температуре минимум 18°C и при внесении смеси микроводорослей *R.. storeatuloformis* и *T. suecica* (минимум 5000 кл/мл), они откладывают яйца, из которых выклюзываются самые мелкоразмерные науплии N1~80 мкм, при плотности 5 экз/мл.

<sup>20</sup> В этих условиях самки ойтон к началу питания личинок рыб производят потомство - науплиев длиной ~80 мкм, которые вырастают за 3-4 суток до ~180 мкм, и служат оптимальной пищей начинающим питаться личинкам рыб, соответствуя размерным и этологическим характеристикам, пищи позволяющие самым ранним личинкам рыб без высоких энергетических затрат потреблять достаточное для повышения их  
<sup>25</sup> выживаемости и роста количество пищи. Размерные характеристики науплиев ойтоны при питании вышеуказанными микроводорослями составляли:

- N1 - 75-88 ( $81 \pm 3$ ) мкм
- N2 - 83-100 ( $91 \pm 6$ ) мкм
- N3 - 100-118 ( $108 \pm 6$ ) мкм
- <sup>30</sup> N4 - 118-128 ( $124 \pm 4$ ) мкм
- N5 - 138-155 ( $147 \pm 6$ ) мкм

N6 - 163-178 ( $171 \pm 6$ ) мкм (Драпун, Ханайченко, 2018), полностью соответствующих размерным и этологическим характеристикам живых кормов, необходимых для перехода личинок рыб на внешнее питание.

<sup>35</sup> Источники информации, принятые во внимание:

1. Драпун И.Е., Ханайченко А.Н. 2018. Морфология науплиальных стадий и продолжительность науплиального периода черноморского вселенца *Oithona davisae* Ferrari and Orsi, 1984 (Copepoda: Oithonidae) в условиях лабораторной культуры / Российский журнал биологических инвазий, 11(4), 17-30.

<sup>40</sup> 2. Губанова А.Д., Гарбазей О.А., Алтухов Д.А., Муханов В.С., Попова Е.В. 2019. *Oithona davisae*: натурализация в Черном море, межгодовые и сезонные изменения, влияние на структуру сообщества планктонных копепод. Океанология. 59(6): 1008-15.  
 3. Серёгин С.А., Попова Е.В. 2016. Многолетняя динамика численности копеподы-вселенца, *Oithona davisae*, в прибрежных водах Черного моря. Российский журнал биологических инвазий.; 9(3):90-100.

45> 4. Ханайченко А.Н. 1988. Питание и продуцирование коловраток в экспериментальных популяциях при комбинированном воздействии температуры и трофических условий. Автореф. к.б.н.. - Минск, 1988. - 24 с.

5. Ханайченко А.Н.; Битюкова, Ю.Е. Избирательность питания личинок калкана и выбор стратегии их кормления // Экология моря. - 1999. - Вып. 48. - С. 63-67.
6. Ханайченко А.Н., Гирагосов В.Е. 2021. Черноморский калкан и его ближайший родственник, тюрбо / Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН. Севастополь: ФИЦ ИНБЮМ, 2021. Ч. 1. 252 с. <https://doi.org/10.21072/978-5-6044865-6-6>.
7. Almeda R., Calbet A., Alcaraz M., Yebra L., Saiz E. Effects of temperature and food concentration on the survival, development and growth rates of naupliar stages of *Oithona davisae* (Copepoda, Cyclopoida) // Marine Ecology Progress Series. 2010. Vol. 410. P. 97-109.
- 10 8. Khanaychenko, A., Mukhanov, V., Aganesova, L., Besiktepe, S., & Gavrilova, N. 2018. Grazing and feeding selectivity of *Oithona davisae* in the Black Sea: importance of cryptophytes. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 18(8), 937-949.
- 15 9. Khanaychenko A.N., Popova O.V., Rylkova O.A., Aleoshin V.V., Aganesova L.O. & Saburova M. 2022. *Rhodomonas storeatuloformis* sp.nov. (Cryptophyceae, Pyrenomonadaceae), a new cryptomonad from the Black Sea: morphology versus molecular phylogeny // Fottea. 2022, 22(1): 122-136 DOI: 10.5507/fot.2021.019.
10. Meeren van der 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 (2-4):375-97.
- 20 11. Saiz E, Griffell K, Calbet A, Isari S. 2014. Feeding rates and prey: predator size ratios of the nauplii and adult females of the marine cyclopoid copepod *Oithona davisae*. Limnology and Oceanography. 59(6):2077-88.
12. Saiz, E., Movilla, J., Yebra L., Barata C, & Calbet A. 2009. Lethal and sublethal effects of naphthalene and 1, 2-dimethylnaphthalene on naupliar and adult stages of the marine cyclopoid copepod *Oithona davisae*. Environmental Pollution, 157 (4), 1219-1226.
- 25 13. Svetlichny, L., Hubareva, E., Khanaychenko, A., Gubanova, A., Altukhov, D., & Besiktepe, S. 2016. Adaptive strategy of thermophilic *Oithona davisae* in the cold Black Sea environment. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 16(1), 077-090. ISSN 1303-2712 DOI: 10.4194/1303-2712-vl6\_1\_09 ISSN 1303-2712.
- 30 14. Uchima, M. 1979. Copulation in the marine copepod *Oithona davisae* Ferrari & Orsi. II. Relationship between copulation and egg-laying. Bull. Plankton Soc. Jpu., 26, 58-76.
15. Vdodovich, I.V., Khanaychenko, A.N., Gubanova, A.D., Kolesnikova, E.A., & Aganesova, L.O. 2017. Identification of some common food items in the guts of fish larvae and juveniles in the Black Sea. Marine Biological Journal, 2(1), 3-10.
- 35 16. Zamora-Terol S., Saiz E. 2013. Effects of food concentration on egg production and feeding rates of the cyclopoid copepod *Oithona davisae*. Limnology and Oceanography. 58(I):376-87.

#### (57) Формула изобретения

Способ культивирования морских циклопоидных копепод *Oithona davisae*, включающий получение исходных взрослых особей ойтон из планктонных проб, отобранных из моря, выдерживание в дезинфицирующем растворе, адаптацию к условиям культивирования, отличающейся тем, что половозрелых самок ойтон содержат на протяжении 4 суток в культиваторе со стерилизованной морской водой при плотности 0.1 экз./мл при ежедневном кормлении нанопланктонными микроводорослями *Prasinophyceae* *Tetraselmis suecica* and *Cryptophyceae* *Rhodomonas storeatuloformis* при концентрации  $10^4$ - $10^5$  кл./мл, а через 12 ч после массового выклева науплиев отделяют от самок и культивируют в течение 12 сут в стерильной морской воде, увеличивая объем культивирования путем добавления среды, постепенно снижая плотность копепод от

5 экз./мл до 0.1 экз./мл с переходом от стадии к стадии вплоть до момента достижения половой зрелости одновозрастной когорты с ежедневной коррекцией концентрации микроводорослей, поддерживая ее на уровне в среднем  $5 \times 10^4$  кл./мл; затем в течение 2 сут стимулируют оплодотворение самок самцами, постепенно сокращая достигнутый 5 культивационный объем путем снижения температуры до 15°C, светового дня до 5 ч и концентрации микроводорослей до  $10^3$  кл./мл, после чего вводят оплодотворенных 10 самок ойтон в состояние гибернации снижением температуры до 10°C; далее самок в контейнерах, наполненных стерильной морской водой с небольшой концентрацией пищи, помещают в холодильную установку при температуре  $7 \pm 1$  °C в полную темноту, где содержат 2-4 месяца в условиях гибернации, еженедельно производя очистку 15 контейнеров и подмену 50% среды, заменяя стерильной морской водой с добавлением  $10^3$  кл./мл микроводорослей; а за 4 сут до даты начала перехода на внешнее питание культивируемых личинок морских рыб у гиберирующих самок ойтон постепенно поднимают температуру до 17°C, промывая стерильным раствором, кормят их смесью микроводорослей с добавлением гетеротрофной динофлагелляты *Oxyrrhls* и переносят в емкости для личинок, в которые продолжают добавлять микроводоросли.

20

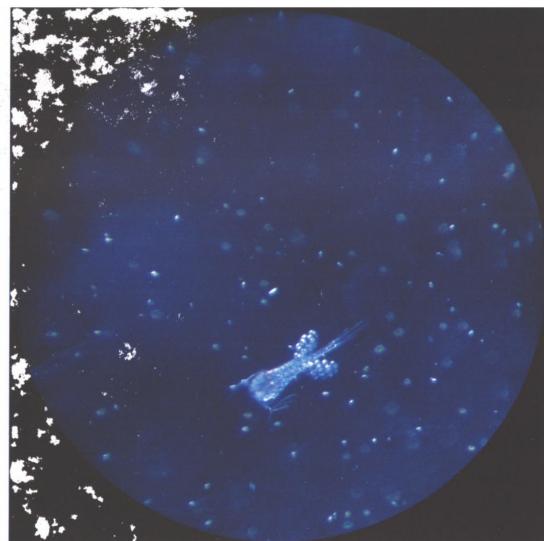
25

30

35

40

45



Фиг. 1

Таблица 1. Последовательность изменения объёма культивационной среды и плотности когорты ойтон до достижения ими половой зрелости

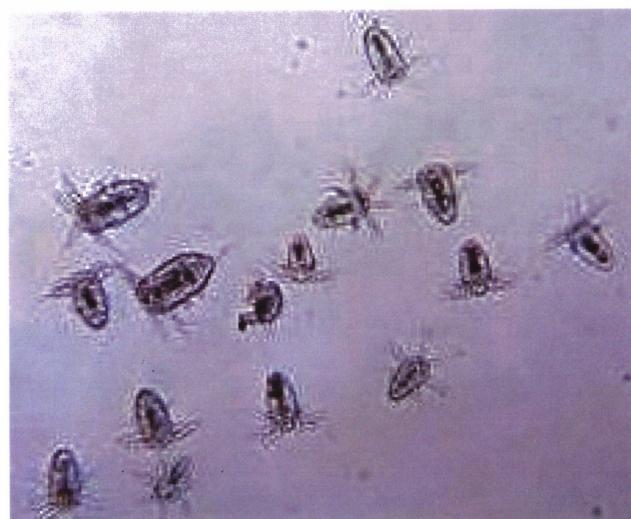
Стадия развития				Численность
Науплиальные- N1-N6	Возраст когорты	Плотность организмов	Объём культуры	ойтон приводится при
Копеподитные C1-C6	сутки	экз/мл	л	выживаемости 100%
N1	1	5	10	50000
N2	2	4.5	11	50000
N3	3	4	13	50000
N4	4	3.5	14	50000
N5	5	3	17	50000
N6	6	2	25	50000
C1	7	1	50	50000
C2	8	0.7	71	50000
C3	9	0.4	125	50000
C4	10	0.3	167	50000
C5	11	0.2	250	50000
C6	12	0.1	500	50000



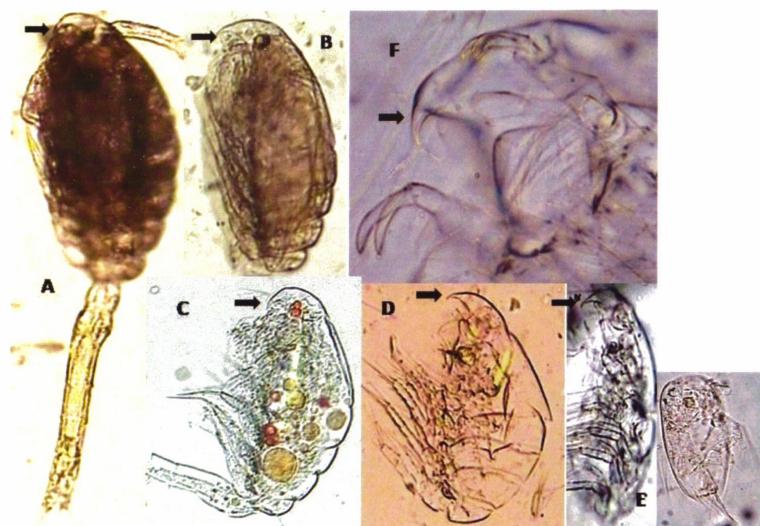
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5