



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A01K 61/00 (2024.01)

(21)(22) Заявка: 2024100880, 16.01.2024
(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.01.2024
Дата регистрации:
01.08.2024
Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 16.01.2024
(45) Опубликовано: 01.08.2024 Бюл. № 22
Адрес для переписки:
690041, Приморский край, г. Владивосток, ул.
Пальчевского, 17, Федеральное
государственное бюджетное учреждение науки
"Национальный научный центр морской
биологии им. А.В. Жирмунского"
Дальневосточного отделения Российской
академии наук (ННЦМБ ДВО РАН)

(72) Автор(ы):
Боцун Людмила Анатольевна (RU),
Масленников Сергей Иванович (RU),
Геворгян Тигран Ашотович (RU),
Пахлеванян Арман Араевич (RU),
Московко Вероника Евгеньевна (RU)
(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки "Национальный научный
центр морской биологии им. А.В.
Жирмунского" Дальневосточного отделения
Российской академии наук (RU)
(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2548107 C1, 10.04.2015. SU
1360680 A1, 23.12.1987. RU 2663328 C1,
03.08.2018. RU 2717990 C1, 27.03.2020. UA 81055
U, 25.06.2013.

(54) Способ интенсивного выращивания коловратки солоноватоводной с применением культур морских микроводорослей

(57) Реферат:
Изобретение относится к морскому
рыбоводству и может быть использовано в
хозяйствах аквакультуры. Способ
характеризуется тем, что микроводоросли рода
Skeletonema культивируют в течение 7 суток при
температуре 21±2°С и освещенности 4000 лк,
свето-темновом режиме 12/12, в приготовленной
на стерильной морской воде соленостью 32‰
питательной среде, которую постепенно
добавляют до объема 200 л. При достижении

численности микроводоросли 349000 млн кл/л
цепочки микроводорослей разделяют на
отдельные клетки и подают в резервуары, где
выращивается коловратка. Изобретение
обеспечивает увеличение численности и
питательных свойств коловратки
солоноватоводной, которая, в свою очередь,
является кормом для культивируемых
гидробионтов. 4 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
A01K 61/00 (2024.01)

(21)(22) Application: **2024100880, 16.01.2024**

(24) Effective date for property rights:
16.01.2024

Registration date:
01.08.2024

Priority:

(22) Date of filing: **16.01.2024**

(45) Date of publication: **01.08.2024** Bull. № 22

Mail address:

**690041, Primorskiy kraj, g. Vladivostok, ul.
Palchevskogo, 17, Federalnoe gosudarstvennoe
byudzhethoe uchrezhdenie nauki "Natsionalnyj
nauchnyj tsentr morskoy biologii im. A.V.
Zhirmunskogo" Dalnevostochnogo otdeleniya
Rossijskoj akademii nauk (NNTSMB DVO RAN)**

(72) Inventor(s):

**Botsun Lyudmila Anatolevna (RU),
Maslennikov Sergej Ivanovich (RU),
Gevorgyan Tigran Ashotovich (RU),
Pakhlevanyan Arman Araevich (RU),
Moskovko Veronika Evgenevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethoe
uchrezhdenie nauki "Natsionalnyj nauchnyj
tsentr morskoy biologii im. A.V. Zhirmunskogo"
Dalnevostochnogo otdeleniya Rossijskoj
akademii nauk (RU)**

**(54) METHOD FOR INTENSIVE CULTIVATION OF BRACHIONUS PLICATILIS USING CULTURES OF
SEA MICROALGAE**

(57) Abstract:

FIELD: fish farming.

SUBSTANCE: invention relates to marine fish farming and can be used in aquaculture farms. Method is characterized by the fact that microalgae of the genus *Skeletonema* are cultivated for 7 days at temperature of 21 ± 2 °C and illumination 4,000 lx, light-dark mode 12/12, in a culture medium prepared on sterile sea water with salinity of 32‰, which is gradually added to volume of 200 l. When the number of microalgae

reaches 349,000 million cells/l, the chains of microalgae are divided into separate cells and fed into reservoirs where the rotifers are grown.

EFFECT: invention provides an increase in the number and nutritional properties of the *Brachionus plicatilis* (euryhaline rotifers), which in turn is a fodder for cultivated hydrobionts.

1 cl, 4 dwg

Изобретение относится к способам культивирования стартовых живых кормов для рыб, в частности для коловратки солоноватоводной.

Известно, что на ранних стадиях развития культивируемым гидробионтам, таким как рыбы и ракообразные, необходимы живые корма. В морской аквакультуре живыми кормами являются такие организмы, как коловратки солоноватоводные *Brachionus plicatilis* и науплиусы артемии *Artemia salina*.

Коловратки и артемии обладают недостаточным питательным составом в природе и не являются естественной добычей культивируемых гидробионтов (Lubzens, E., 2003). Тем не менее их быстрый темп размножения при высокой плотности в большинстве случаев более значителен, чем недостаток питательности. Питательные качества коловраток и артемий улучшались за счет изменения их рациона, в частности, для повышения содержания высоконенасыщенных жирных кислот (например, докозагексаеновой кислоты и эйкозапентаеновой кислоты) путем отбора штаммов микроводорослей. Производство коловраток первоначально основывалось на кормлении живыми микроводорослями (*Nannochloropsis* sp., *Tetraselmis* sp., *Pavlova lutheri* и *Isochrysis galbana*) или пекарскими дрожжами. Коловратки, которых кормили микроводорослями, быстро обогащались аскорбиновой кислотой (Kararapu J., 2018).

Диатомовые микроводоросли обитают во всех фотозонах и очень чувствительны к малейшим изменениям физико-химических характеристик окружающей их экосистемы, что делает их идеальными кандидатами для экологического мониторинга. Их высокая адаптируемость к широкому спектру сред подтверждает их потенциальное применение в различных областях. Высокая скорость роста даже при низкой освещенности и градиентах температуры, способность расти в крупномасштабных системах культивирования, образование биопленок, приводит к энергоэффективному сбору урожая (Marella T. K., 2020).

Диатомовые микроводоросли, которые служат кормом для живых кормов, помимо того, что имеют высокий темп роста, еще и неприхотливы в выращивании. Содержание 40% белков, 30% углеводов, 30% липидов и витаминов в культуре микроводорослей является одной из основных причин использования их в качестве корма (Aji L. P., 2011). В составе белков присутствуют все незаменимые аминокислоты. В составе липидов много ненасыщенных жиров, свободных жирных кислот, в том числе незаменимая линолевая кислота. Потребление азота и фосфора диатомовыми микроводорослями в условиях интенсивного культивирования широко используется в аквакультуре. В качестве корма микроводоросли, выращиваются в промышленных масштабах в ряде стран мира, например, таких как Индия, Испания и др. (Бородина А. В., 2005).

Известен способ лабораторного культивирования диатомовых микроводорослей при свето-темновом режиме 18/6 (1000-1200 лк). Температура 20–24°C, соленость 20–24 г/л, pH 8,2–8,7 перемешивание культур происходило с помощью аэратора (Ashokkumar S., 2015). Питательная среда состоит из макро, микроэлементов и витаминов: г/литр: 1) NaNO_3 - 75, 2) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 5, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ - 30, 3) $\text{Na}_2\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 4,36, (Na_2EDTA), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0.01, 4) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0.01, 5) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 3.15, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0.18, 6) $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0.006, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.022, Thiamin HCl - 0.1, 7) Biotin - 0.0005, B12 - 0.0005. В отличие от данного способа, в нашем освещении составляет от 2000 лк, соленость 32‰, в питательной среде не используются витаминные добавки.

Известен способ кормления науплиусов артемии семью видами монокультур микроводорослей: Prymnesiophyceae (*Isochrysis galbana*); Dinophyceae (*Prorocentrum micans*, *Gymnodinium wulffii*, *Prorocentrum cordatum*); Chlorodendrophyceae (*Tetraselmis suecica*);

Bacillariophyceae (*Phaeodactylum tricornutum*) цисты артемий инкубировали при температуре 28°C в сосудах с фильтрованной морской водой соленостью 18 ‰, при постоянной аэрации и круглосуточном искусственном освещении. Выживаемость науплиусов при питании *P. cordatum*, *P. Micans* и *T. suecica* достигала максимального значения (выше 95%) (Смирнов Д. Ю., 2019).

Способ культивирования коловраток (Пат. SU 1360680) предусматривает повышение продуктивности коловраток путем подавления роста простейших. Для этого после каждой подачи кормовой суспензии проводят циркуляцию культуральной среды по замкнутому контуру с помощью установки. В отличие от данного способа, насос не используется.

Известен способ при котором клон *Isochrysis* aff. *Galbana* T-ISO культивировали полунепрерывно со скоростью обновления от 10 до 50% объема культуры в сутки. Коловратки, которых кормили микроводорослями из культур с достаточным количеством питательных веществ и высокой скоростью обновления, показали более высокий сухой вес и увеличение белка до 60%, липидов до 35% и 100%. % содержания углеводов (Ferreira M., 2008). Похожие результаты были при применении в качестве корма коловраткам, микроводоросли *Nannochloropsis gaditana* (Ferreira M., 2009).

Наиболее близкий к заявленному технологическому способу является способ культивирования диатомовой микроводоросли *Chaetoceros calcitrans* для личинок гигантской устрицы (Пат. RU 2663328 C1). При данном способе водоросль культивировали в течение 11 суток, при температуре 22-24°C, освещенности 10 клк, аэрации смесью воздуха и углекислого газа (2%), на модифицированной питательной среде на основе стерильной морской воды соленостью 18‰. Содержание биогенных элементов пропорционально увеличивали до следующих значений, г/л: NaNO₃ - 600, NaH₂PO₄·2H₂O - 40, FeCl₃·6H₂O - 28, Na₂ЭДТА - 34,88, Na₂SiO₃·9H₂O - 240, MnCl₂·4H₂O - 1,8. Способ обеспечивает максимальное накопление биомассы водоросли. В отличие от данного, при нашем способе длительность выращивания культуры 7 суток при солености 32‰, питательная среда состоит из меньшего количества элементов.

Также близкий к заявленному изобретению является способ получения живых кормов для личинок морских рыб (Пат. RU0002717990). Способ заключается в том, что за двое суток до использования коловраток в качестве корма их переводят на питание динофлагеллятами *Prorocentrum cordatum* и *Prorocentrum micans*. при начальной концентрации микроводорослей в среде 5×10⁴ кл/мл. Способ обеспечивает получение живых кормов, имеющих высокое содержание докозагексаеновой и эйкозапентаеновой кислот.

Задачей способа «Интенсивного выращивания коловратки солоноватоводной с применением культур морских микроводорослей» является увеличение численности и питательности коловраток, выращенных на диатомовых микроводорослях, для применения в хозяйствах аквакультуры.

На фиг. 1 представлен рост численности клона микроводоросли рода MBRU_Skel22 *Skeletonema* sp. взятый из биобанка ННЦМБ. В течение 7 дней выращивания культура быстро достигает численности 349000 млн кл/л, что достаточно для питания культуры коловраток.

На фиг. 2 представлен рост биомассы культуры микроводорослей *Skeletonema* sp. Биомассы 201,024 мг/м³ культура так же достигла в течение 7 дней.

Фиг. 3 отображает рост численности самой кормовой культуры коловратки достигшей пика численности 134 экз/мл. уже на 5-й день кормления диатомовой микроводорослью.

На фиг. 4 представлена схема дозированной подачи культуры в виде отдельных

клеток микроводорослей культуре коловраток с помощью насоса подключенного к розетке с регулятором.

Техническим результатом изобретения является получение высококачественного корма для увеличения численности и питательности коловратки солоноватоводной, выращиваемой на хозяйствах аквакультуры, которая, в свою очередь, является кормом для многих культивируемых гидробионтов.

Поставленная задача и заявленный технический результат достигаются способом интенсивного выращивания коловратки солоноватоводной с применением культур морских микроводорослей, характеризующимся тем, что микроводоросли рода *Skeletonema* культивируют в течение 7 суток, при температуре $21 \pm 2^\circ\text{C}$ и освещенности 4000 лк, свето-темновом режиме 12/12, в приготовленной на стерильной морской воде соленостью 32‰ питательной среде, которую постепенно добавляют до объема 200 л, при достижении численности микроводоросли 349000 млн кл/л, цепочки микроводорослей разделяют на отдельные клетки, и подают в резервуары, где выращивается коловратка.

Микроводоросли выращиваются накопительным способом на питательной среде f/2 в течение 7 суток, при температуре $21 \pm 2^\circ\text{C}$, свето-темновой режим 12/12, освещенность от 4000 лк. Питательная среда приготовлена на стерильной морской воде соленостью 32 ‰ и состоит из макро и микроэлементов г/литр: 1) NaNO_3 - 75; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 5, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ - 30, 3) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0.01, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.022, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0.01, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0.18, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0.006, 4) Na_2EDTA - 4,3, 5) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 3.15, не включая витамины, что значительно удешевляет культивирование. Длинные цепочки диатомей разбивают на отдельные клетки и в таком виде подают коловраткам.

Способ реализуется следующим образом:

1) Клон культуры диатомовой микроводоросли MBRU_Skel22 *Skeletonema* sp. взятый из биобанка ННЦМБ ДВО РАН (<http://marbank.dvo.ru/index.php/ru/>) выращивается на питательной среде f/2, приготовленной на стерилизованной морской воде соленостью 32‰. Освещается диодной лампой 4000 лк, при стандартной температуре $21 \pm 2^\circ\text{C}$, перемешивается с помощью кислородного камня.

2) Доводится до объема 200 л путем постепенного добавления питательной среды.

3) При достижении численности 349000 млн кл/л цепочки микроводорослей разделяются на отдельные клетки.

4) Перед добавлением клеток, коловраток выдерживали сутки без питания для достижения более достоверного результата.

Численность коловраток, 134 экз./мл, при начальной 29 экз./мл, достигается на 5-й день выращивания (рис 3).

Пример реализации изображен на фигуре 4. Питательная среда хранится в отдельном резервуаре (1). Подается самотеком по трубке с регулятором (2) в прозрачную ёмкость, где содержится культура микроводорослей (3). С помощью насоса (4) по шлангу (5) культура микроводорослей в необходимом количестве подается в резервуары, где выращивается коловратка (6). Все наливные шланги оборудованы регуляторами (7). Фотобиореактор с микроводорослями оборудован кислородным камнем (8) для перемешивания культуры. Лампа освещения (9), длиной с фотобиореактор, питается от розетки с регулятором (10), от такой же розетки питается подающий насос. Каждая емкость оборудована сливными отверстиями с регулятором (11).

Список источников

1. Aji L.P. The use of algae concentrates, dried algae and algal substitutes to feed bivalves //

Makara Journal of Science. – 2011. – Т. 15. – №. 1. – С. 1.

2. Lubzens E. et al. Production and nutritional value of rotifers //Live feeds in marine aquaculture. – 2003. – С. 300-303.

3. Капарату J. Application of microalgae in aquaculture // Phykos. – 2018. – Т. 48. – №. 1. – С. 21-26.

4. Бородина А.В., Шахматов А.П. Потребление азота и фосфора диатомовой микроводорослью *Phaeodactylum tricornutum* Bohl. в условиях интенсивного культивирования. Всеукр. науч.-практ. конф. мол. учёных по проблемам Черного и Азовского морей (24-27 мая 2005 г.). – Севастополь, 2005. – С. 16-17.

5. Marella T.K., López-Pacheco, I. Y., Parra-Saldívar, R., Dixit, S., Tiwari, Wealth from waste: Diatoms as tools for phycoremediation of wastewater and for obtaining value from the biomass //Science of the Total Environment. – 2020. – Т. 724. – С. 137960.

6. Пат. RU0002717990 МПК A01K 61/00 СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЖИВЫХ КОРМОВ ДЛЯ ЛИЧИНОК МОРСКИХ РЫБ / Авторы: Ханайченко Антонина Николаевна. Патентообладатели Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН» (ФИЦ ИнБЮМ) (RU), Дата подачи заявки: 14.03.2019, опубл. 27.03.2020, Бюл. № 9.

7. Пат. RU 2663328 C1 МПК A01K 61/00 СПОСОБ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДИАТОМОВОЙ ВОДОРОСЛИ *CHAETOCEROS CALCITRANS*- КОРМА ДЛЯ ЛИЧИНОК ГИГАНТСКОЙ УСТРИЦЫ *CRASSOSTREA GIGAS* / Авторы Ладыгина Людмила Владимировна (RU), Пиркова Анна Васильевна (RU). Патентообладатели Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН» (ФИЦ ИнБЮМ) (RU), (22) Дата подачи заявки: 19.06.2017. (45) Оpubл. 03.08.2018, Бюл. № 22.

8. Пат. SU 1360680 A01K 61/00 Способ культивирования коловраток / Авторы БАКАЕВА ЕЛЕНА НИКОЛАЕВНА, АКСЕНОВА ЕЛЕНА ИВАНОВНА, СТРОГОВ ВЛАДИМИР ПАВЛОВИЧ (SU). Патентообладатель Азовский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства. Дата подачи 9.06.1986, дата публикации 23.12.1987, Бюл. № 47.

9. Ashokkumar S., Manimaran K., Kim K. Cultivation and identification of microalgae (Diatom) //Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications. – 2015. – С. 59-78.

10. Смирнов Д. Ю., Аганесова Л. О., Ханайченко А. Н. Изменчивость размерных характеристик и выживаемости науплиусов крымских артемий *Artemia* spp.(Branchiopoda: Anostraca) при питании микроводорослями разных видов //Морской биологический журнал. – 2019. – Т. 4. – №. 1. – С. 91-99.

11. Ferreira M. et al. Enriching rotifers with “premium” microalgae. *Isochrysis* aff. *galbana* clone T-ISO //Aquaculture. – 2008. – Т. 279. – №. 1-4. – С. 126-130.

12. Ferreira M. et al. Enriching rotifers with “premium” microalgae. *Nannochloropsis gaditana* //Marine Biotechnology. – 2009. – Т. 11. – С. 585-595.

13. Munday R. et al. Acute toxicities of saxitoxin, neosaxitoxin, decarbamoyl saxitoxin and gonyautoxins 1&4 and 2&3 to mice by various routes of administration // Toxicon. – 2013. – Т. 76. – С. 77-83.

(57) Формула изобретения

Способ интенсивного выращивания коловратки солоноватоводной с применением культур морских микроводорослей, характеризующийся тем, что микроводоросли рода

Skeletonema культивируют в течение 7 суток при температуре $21 \pm 2^\circ\text{C}$ и освещенности 4000 лк, свето-темновом режиме 12/12, в приготовленной на стерильной морской воде соленостью 32‰ питательной среде, которую постепенно добавляют до объема 200 л, при достижении численности микроводоросли 349000 млн кл/л, цепочки микроводорослей разделяют на отдельные клетки и подают в резервуары, где выращивается коловратка.

10

15

20

25

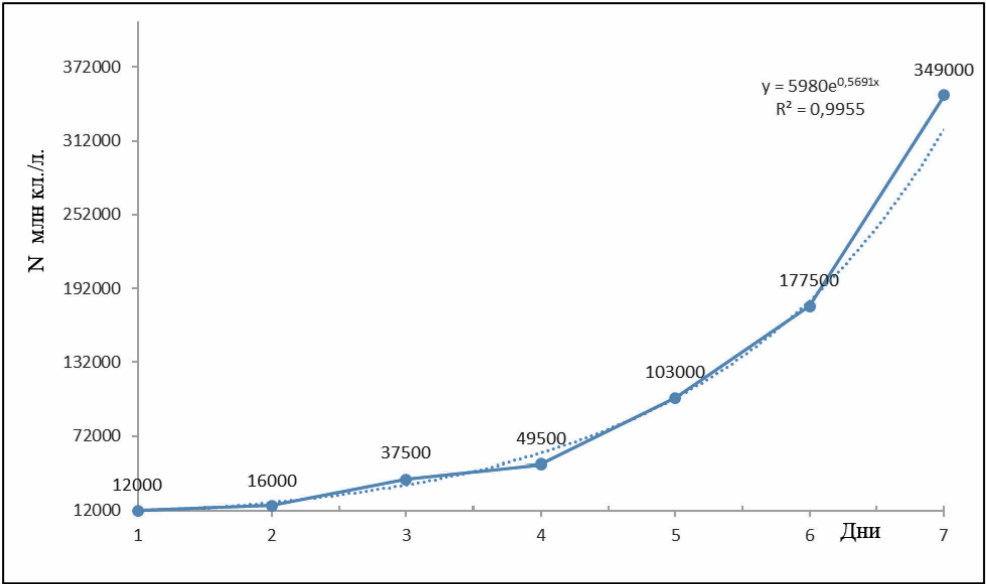
30

35

40

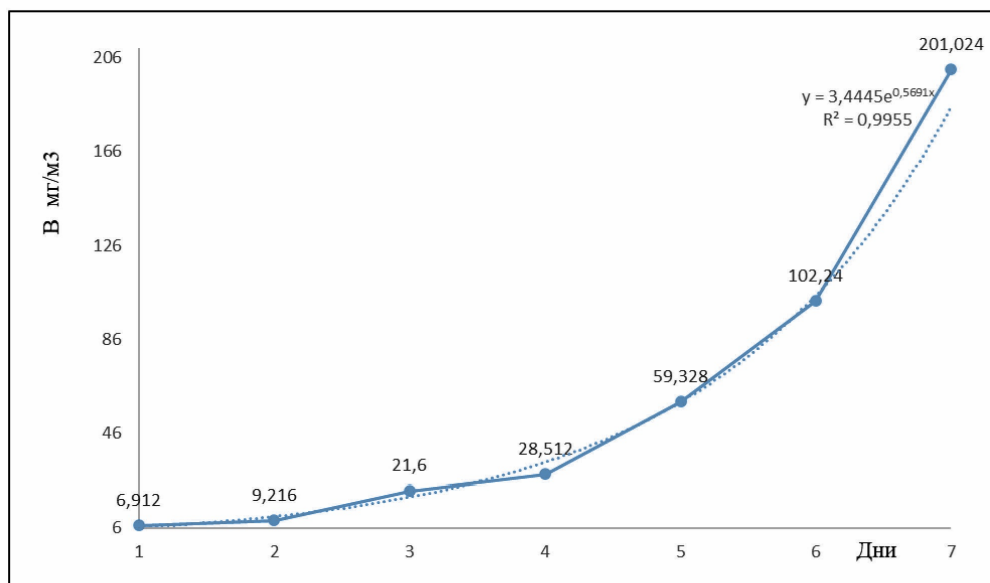
45

1

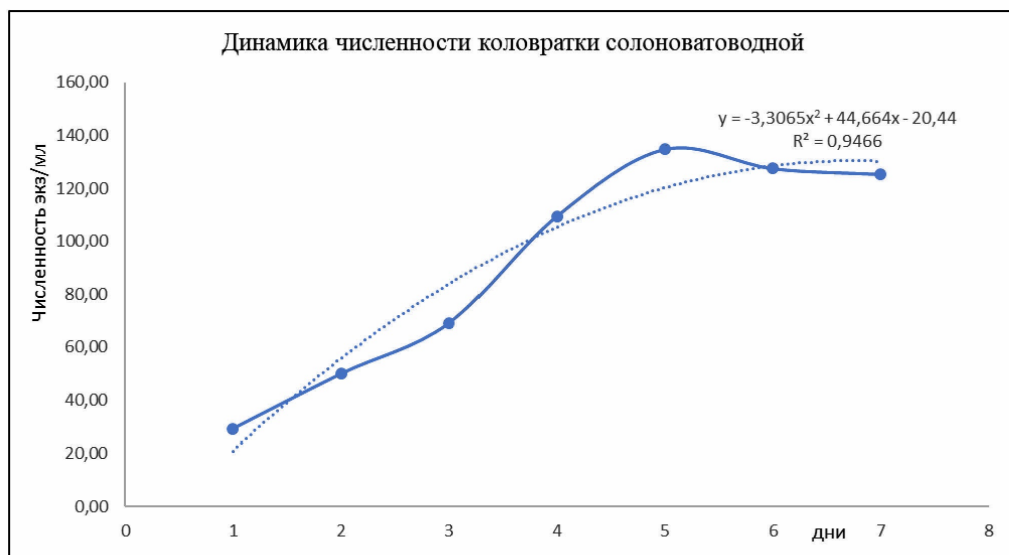


Фиг. 1

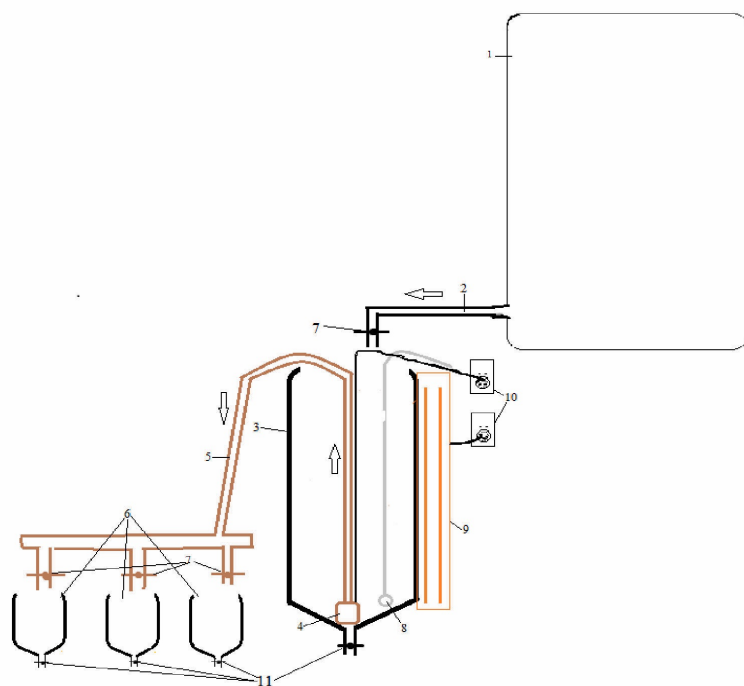
2



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4