

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A01K 61/00 (2025.08)

(21)(22) Заявка: 2025111772, 05.05.2025

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
05.05.2025Дата регистрации:
24.10.2025

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 05.05.2025

(45) Опубликовано: 24.10.2025 Бюл. № 30

Адрес для переписки:

299011, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2,
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Федеральный
исследовательский центр "Институт
биологии южных морей имени А.О.
Ковалевского РАН",
отдел охраны интеллектуальной собственности

(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: RU 2614644 C1, 28.03.2017. RU
2541458 C1, 10.02.2015. UA 81055 U, 25.06.2013.C1
5
8
3
9
4
2
8
U
RR U
2 8 4 9 3 8 5
C 1

(54) СПОСОБ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МОРСКИХ ГАРПАКТИОИДНЫХ КОПЕПОД TISBE FURCATA - ЖИВЫХ КОРМОВ ДЛЯ ЛИЧИНОК ЦЕННЫХ МОРСКИХ РЫБ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области морской аквакультуры и предназначено для получения корма для личинок рыб. От диких самок из природной популяции получают первое поколение науплиев и при достижении ими половозрелости формируют маточное стадо, при соотношении самцов к самкам не менее 1:4. Стадо кормят смесью микроводорослей Phaeodactylum tricornutum, Rhodomonas salina с добавлением Tetraselmis в объемном соотношении культур 3:3:1, содержат при слабой аэрации в световом режиме 12:12 ч ночь : день при освещенности 500 люкс и ежедневной подмене 1/10 объема свежей стерилизованной морской водой в течение 3 суток. Затем отделяют самок с яйцевыми мешками и помещают в резервуары со стерильной морской водой с добавлением микроводорослей и в течение 15 суток, регулярно, 2 раза в неделю, отделяют от производителей науплиев

гарпактицид. Для дальнейшего выращивания когортной популяции вновь отделяют науплиев от самок путем концентрации на свет и отделением через сито, и пересаживают в емкости со стерильной морской водой, добавляя смесь микроводорослей Isochrysis galbana и Phaeodactylum tricornutum ~10⁵ кл/мл, продолжая выращивать гарпактицид до половозрелости в течение 12 суток при температуре 15-25°C, при ежедневном добавлении микроводорослей Isochrysis galbana для ранних наупиальных стадий, Phaeodactylum tricornutum и Tetraselmis suecica при переходе к копеподитным стадиям, и Rhodomonas sp. при достижении половозрелости до возраста самок не более 24-26 суток, после чего заменяют на подготовленную новую когорту производителей, полученных из первых партий науплиев. Изобретение обеспечивает получение

R U 2 8 4 9 3 8 5 C 1

популяции *Tisbe furcata*, для кормления личинок рыб. 1 ил., 1 табл., 1 пр.

R U 2 8 4 9 3 8 5 C 1

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
A01K 61/00 (2025.08)

(21)(22) Application: 2025111772, 05.05.2025

(24) Effective date for property rights:
05.05.2025Registration date:
24.10.2025

Priority:

(22) Date of filing: 05.05.2025

(45) Date of publication: 24.10.2025 Bull. № 30

Mail address:
299011, g. Sevastopol, pr. Nakhimova, 2,
Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
uchrezhdenie nauki Federalnyj issledovatelskij
tsentr "Institut biologii yuzhnykh morej imeni A.O.
Kovalevskogo RAN", otdel okhrany intellektualnoj
sobstvennosti(72) Inventor(s):
Khana jchenko Antonina Nikolaevna (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
5
8
4
9
3
8
2
R
UR
U
2
8
4
9
3
8
5
C
1(54) METHOD FOR CULTIVATING MARINE HARPACTICOID COPEPOD TISBE FURCATA - LIVE FOOD
FOR LARVAE OF VALUABLE MARINE FISH

(57) Abstract:

FIELD: marine aquaculture.

SUBSTANCE: invention is intended for producing feed for fish larvae. The first generation of nauplii is obtained from wild females from the natural population, and when they reach sexual maturity, a broodstock is formed with a male to female ratio of at least 1:4. The broodstock is fed a mixture of the microalgae Phaeodactylum tricornutum, Rhodomonas salina with the addition of Tetraselmis in a volume ratio of 3:3:1, kept under weak aeration in a 12:12 hour night:day light regime at an illumination of 500 lux and with a daily replacement of 1/10 of the volume with fresh sterilised seawater for 3 days. Then, females with egg sacs are separated and placed in tanks with sterile seawater with the addition of microalgae, and for 15 days, regularly, twice a week, harpacticocysts nauplii are separated from the producers. For further cultivation of the cohort population, the nauplii are again separated from the

females by concentration in light and separation through a sieve, and transferred to containers with sterile seawater, adding a mixture of microalgae Isochrysis galbana and Phaeodactylum tricornutum ~10⁵ cells/ml, continuing to grow harpacticocysts to sexual maturity for 12 days at a temperature of 15-25 °C, with daily addition of microalgae Isochrysis galbana for early nauplius stages, Phaeodactylum tricornutum and Tetraselmis suecica during the transition to the copepodite stages, and Rhodomonas sp. upon reaching sexual maturity to a female age of no more than 24-26 days, after which they are replaced with a prepared new cohort of producers obtained from the first batches of nauplii.

EFFECT: obtaining a population of Tisbe furcata for feeding fish larvae.

1 cl, 1 dwg, 1 tbl, 1 ex

Изобретение относится к области морской аквакультуры и предназначено для получения полноценных живых кормовых организмов в размерном диапазоне 50 - 950 мкм, которые могут быть использованы при культивировании личинок ценных пород морских промышленных и аквариумных рыб и ракообразных, а также для проведения 5 экспериментальных работ по морской биологии, планктонологии, физиологии и биохимии и для биологического тестирования в области морской токсикологии.

Выживаемость и развитие ранних личинок (в течение длительного периода до возраста 30-45 сут) ценных пород морских рыб с пелагической икрой обуславливается безальтернативным (невозможностью замены на инертные корма) переходом на внешнее

10 питание живыми кормовыми объектами необходимого размера, соответствующего размерам их рта и поведенческим характеристикам, особенно на ранних этапах развития в короткий период перехода от эндогенного к экзогенному питанию, а также в процессе подготовки и прохождения в процессе их развития критических фаз метаморфоза, и кормовые объекты должны соответствовать метаболическим потребностям личинок

15 в определенных эссенциальных биохимических компонентах. Имея отрицательный энергетический баланс при небольших эндогенных запасах, ранние личинки рыб (с пелагической икрой) для перехода на внешнее питание нуждаются в своевременном потреблении на начальных этапах питания мелкоразмерного живого корма оптимального размера, и для повышения выживаемости и скорости роста личинок,

20 размер и масса живого корма должны возрастать по мере роста личинок для поддержания их метаболизма и роста. При выращивании личинок морских рыб по интенсивной технологии аквакультуры в качестве начальных живых кормов при переходе на внешнее питание обычно используют солоноватоводных коловраток *Brachionus plicatilis* Muller, которые считаются высокотехнологичными, так как в

25 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). Следующим после коловраток живым кормом являются более крупные живые корма - науплии артемии, имеющие высокое содержание белка и чрезмерно высокое содержание жиров. Однако

30 жирнокислотный и аминокислотный состав солоноватоводных коловраток и артемии, их, иногда, несоответствующий размер, не соответствуют поведенческим, биохимическим и энзиматическим потребностям ранних личинок ценных пород морских рыб.

В отличие от них, морские копеподы обладают превосходными питательными качествами, высокой степенью перевариваемости, большим диапазоном размерного 35 ряда стадий развития и являются важным источником пищи для личинок, метаморфизирующих личинок и молоди морских рыб и ракообразных, обеспечивая норму их развития и снижение приобретенных аномалий в процессе выращивания. Однако, каланоидные копеподы требуют больших объемов для выращивания, в связи с высокой чувствительностью к плотности посадки и качеству воды.

40 В отличие от каланоидных, гарпактикоидных копепод можно выращивать в культурах с более высокой плотностью; лимитирующим фактором для них является площадь поверхности субстрата в большей степени, чем объем; они более толерантны к высокой концентрации органики в воде; широкий диапазон размеров гарпактикоидных копепод на разных стадиях развития делает их пригодными для питания ими личинок 45 и молоди рыб.

Гарпактикоидные копеподы литорального космополитического вида *Tisbe furcata* Baird, 1837 (отр. Награстикоида, п/класс Сорепода), являются представителями мейофауны; они встречаются в приливно-отливных и мелководных биотопах, среди водорослей

или на дне, где часто является доминирующим видом, и могут колонизировать илистые отложения. Их младшие (науплиальные) стадии свободно плавают под поверхностью водной пленки и в водной толще, а поздние копеподитные и взрослые стадии способны быстро перемещаться в толще воды, и поэтому часто встречаются и в прибрежном

5 планктоне; то есть эти гарпактициды являются меропланктонными организмами и одними из самых распространенных прибрежных мезопланктонных ракообразных. В естественных биотопах эти гарпактициды являются важной компонентой питания, а, иногда и основной пищей для мелких личинок и молоди (до 30-60 мм) некоторых промысловых рыб (камбаловых и лососевых) или планктонных мелких видов рыб,

10 которые сами являются пищей для промысловых видов.

Ферментативная система гарпактицид позволяет им переваривать широкий спектр органических веществ пищи, которую они преобразовывают в белки и липиды (триглицериды и фосфолипиды) с высоким содержанием высоконенасыщенных эссенциальных жирных кислот (Drillet et al. 2011). То есть, независимо от состава их 15 пищи, гарпактикоидные копеподы содержат большое количество ненасыщенных жирных кислот, особенно n-3 жирных кислот, по сравнению с многими другими живыми кормами, используемыми в аквакультуре, и поэтому отсутствует необходимость в дополнительном искусственном насыщении их эссенциальными компонентами перед скармливанием культивируемым личинкам рыб и ракообразным, как в случае с 20 коловратками и науплиями артемии.

Гарпактикоидные копеподы, в частности р. *Tisbe*, были признаны хорошими кандидатами живых кормов для использования в аквакультуре, поскольку они обладают дополнительными характеристиками, облегчающими их массовое культивирование, такими как: высоким репродуктивным потенциалом (большой плодовитостью), 25 коротким периодом генерации, высокой выживаемостью в процессе развития и высокими темпами роста популяции в широком диапазоне температуры и солености, гибкостью в питании разнообразными источниками пищи (микроводоросли, преферментированные макрофиты, дрожжи, сухие корма, детрит, бактерии), и обеспечивают широкий спектр размеров живых кормов (от 50 до 950 мкм), подходящих для личинок морских рыб в 30 процессе их развития в условиях аквакультур от начала экзогенного питания до перехода на инертные корма, то есть в течение первых 30-45 суток, толерантность к экстремальным изменениям окружающей среды, питание

Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что они могут быть подходящим живым кормом для личинок морских рыб, и что их использование приводит к 35 аналогичным улучшениям при развитии личинок, как и в случае с каланоидными копеподами.

Известен способ массового культивирования копепод *T. furcata* совместно с солоноватоводными коловратками (Devauchelle, Girin, 1974) при кормлении их смесью 40 микроводорослей *Tetraselmis* (10^6 кл/мл) и *Dunaliella tertiolecta* ($3 \cdot 10^6$ кл/мл) на протяжении от 15 до 60 сут при нерегулируемом колебании плотности разных стадий гарпактицид в смешанной культуре от 3 до 15 экз/мл. Этот экспериментальный метод позволял совместить пространственно два кормовых организма, но не позволял ни достичь высокой плотности обоих организмов, ни получать их стандартную биомассу в конкретные сроки.

45 Известен способ культивирования *Tisbe furcata* как одного из компонентов поликультуры морского и солоноватоводного зоопланктона накопительным и полунепрерывным способами (Новоселова, Каниева, 2020) совместно с инфузориями, коловратками, кладоцерами и другими видами копепод при использовании в качестве

корма сложной питательной смеси (натрий азотнокислый NaNO₃ или мочевины, крахмала, амилодекстрин, (C₆H₁₀O₅)_n; витаминов группы В; глюкозы, Д-маннита, мальтозы, фруктозы, сахарозы; аминокислот метионина и лизина, конского навоза, сена, сухой банановой кожуры; куриного желтка, эмульгированного с кукурузным маслом и коровьим молоком), способствующей созданию трофической цепочки «питательная смесь - микрозоопланктон / фитопланктон - мезозоопланктон» в стеклопластиковых емкостях объемом от 100 л до 16 м³ и солоноватоводных земляных прудах площадью 0,01 га, при продолжительности культивирования зоопланктона 5 организмов в поликультуре от 25 до 50 суток при колебаниях температурного режима от 8 до 25°C и использования получаемой сырой биомассы зоопланктона для кормления личинок и молоди морских рыб. В начале культивирования преобладает смесь диатомовых водорослей (до 80%) (*Thalassiosira lacustris*, *Skeletonema costatum*, *Navicula radiosa*, *Coscinodiscus radiatum*, *Chaetoceros proctors*, *Prorocentrum micans*, *Chlorella vulgaris*, *Platymonas* sp., *Chlamidomonas pertusa*, *Cosmarium* sp., *Cladophora glomerata*, *Microcystis flos-aquae*, *Oscillatoria amphibia*, на 20-е сутки выращивания достигая в совокупности 120×10^6 кл/мл), и в поликультуре зоопланктона преобладали инфузории и коловратки, и дополнительно к ним мезозоопланктон, включающий веслоногих и ветвистоусых ракообразных. Однако, вариабельность и непредсказуемость динамики 10 популяций в такой сложной системе и изменений как качественного, так и количественного состава, как микроводорослей, так и зоопланктона, не позволяет с точностью предсказать получение определенного количества (и, соответственно, биомассы) детерминированных стадий развития конкретных видов живых кормов 15 (коловраток, кладоцер, копепод), и, в рассматриваемом случае, гарпактикоидных копепод *T. furcata*. 20

Известен способ выращивания *T. furcata* в цементных прудах при кормлении комбинированным кормом, состоявшим из ферментированной смеси морского огурца с саргассовыми водорослями (макрофитами), порошком из мантии моллюска морского гребешка с добавлением пекарских дрожжей и кукурузной муки, который, как считается 25 авторами, приводит к удешевлению получения биомассы копепод (Wang et al., 2017), при котором за 20 суток происходит возрастание численности гарпактикоидных копепод от 30 до 250 экз/л. Однако, применение отходов экзотических морепродуктов нереально в местных условиях, не удешевляет стоимость копепод, которые в приведенных условиях демонстрируют низкую скорость роста численности популяции (г, сут⁻¹=0.11). 30

Известен способ массового культивирования близкородственного *Tisbe furcata* вида гарпактицид - *Tisbe biminiensis* с применением в качестве питательного субстрата промышленных инертных кормов (используемых для кормления личинок и молоди морских рыб и морских креветок): Alcon Basic®, Nutripeixe AL55® (FD) и Camaronina CR1® (MSD) (Ribeiro, Souza-Santos, 2013). Однако, несмотря на кажущееся упрощение 40 технологии, этот способ затратен и недоступен в современных условиях отечественных марихозяйств.

Задачей предлагаемого способа является разработка технологии культивирования морских гарпактикоидных копепод *Tisbe furcata*.

Технический результат от реализации способа заключается в получении массовой 45 искусственной моновидовой популяции *T. furcata*, применяемой для кормления самых ранних стадий личинок рыб; в возможности подращивания до определенного возраста в когортных популяциях *T. furcata* с целью кормления более поздних стадий личинок рыб; в использовании для получения новой взрослой эксплуатируемой популяции.

Заявленный технический результат достигается тем, что, Способ культивирования морских гарпактикоидных копепод *Tisbe furcata* - живых кормов для личинок ценных морских рыб, включает отлов особей из природной популяции, формирование маточного стада. В способе от диких самок *T. furcata* из природной популяции получают первое поколение науплиев и при достижении ими половозрелости формируют маточное стадо *T. furcata* в возрасте 11-12 суток, состоящее из самцов и самок (при соотношении не менее 1:4 для повышения эффективности их копуляции), которых кормят смесью микроводорослей *Phaeodactylum tricornutum*, *Rhodomonas salina* с добавлением *Tetraselmis* в объемном соотношении культур 3:3:1, содержат при слабой аэрации в световом режиме 12:12 ночь\день при освещенности 500 люкс и ежедневной подмене 1/10 объема свежей стерилизованной морской воды в течение 3 суток. Затем отделяют самок с яйцевыми мешками и помещают в резервуары со стерильной морской водой с добавлением микроводорослей и в течение 15 сут регулярно, 2 раза в неделю, отделяют от производителей науплиев гарпактицид, которых используют для кормления личинок на ранних стадиях развития. Для дальнейшего выращивания когортной популяции вновь отделяют науплиев от самок путем концентрации на свет и отделением через сито, и пересаживают в емкости со стерильной морской водой, добавляя смесь микроводорослей *Isochrysis galbana* и *Phaeodactylum tricornutum* $\sim 10^5$ кл/мл, продолжая выращивать гарпактицид до половозрелости в течение 12 суток при температуре 15-25° С при ежедневном добавлении микроводорослей *Isochrysis galbana* для ранних науплиальных стадий, с добавлением *Phaeodactylum tricornutum* и *Tetraselmis suecica* при переходе к копеподитным стадиям, и добавлением *Rhodomonas sp.* при достижении половозрелости до возраста самок не более 24-26 сут, после чего заменяют на подготовленную новую когорту производителей, полученных из первых партий науплиев.

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

- впервые определены в стандартных температурных, трофических и плотностных условиях стандартизации процессов производства науплиев в искусственной популяции *T. furcata*, установлены средние и максимальные величины и частота кладок яиц в яйцевых мешках у самок, длительность эмбрионального развития и длительность развития до достижения половозрелости, величина генерации;

- проведение дезинфекции кладок яиц позволяет освободиться от патогенных микроорганизмов, влияющих как на выживаемость самих *T. furcata*, так и при использовании их в качестве живых кормов, на выживаемость личинок рыб;

- предлагаемый способ получения когорт науплиев удобно применять для кормления личинок, концентрируя на сито определенного размера заранее рассчитанный объем когорты науплиев определенного возраста;

- предлагаемый способ позволяет получать полноценные кормовые организмы для дополнительного качественного прикорма личинок морских рыб до возраста 10 сут науплиями *T. furcata* в дополнение к коловраткам, и копеподитными стадиями *T. furcata* после 10 сут в дополнение к метанауплиям артемий;

- в отличие от используемых в интенсивной ларвикультуре коловраток, получаемые предложенным способом кормовые организмы *Tisbe* не создают избыточных концентраций кормовых объектов в выростных системах, не создают избыточных метаболитов, приводящих к повышению бактериального титра, напротив, науплии *T. furcata* питаются бактериями на поверхности пленки воды, а копеподитные и взрослые *T. furcata* очищают от бактерий и детрита стенки и дно выростных емкостей, таким

образом снижая образование поверхностной и донной бактериальных пленок, препятствующих норме развития личинок;

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

Изобретение поясняется описанием и иллюстрацией. На Фиг. 1 - Циклопоидные копеподы *Tisbe furcata* (самка с большим яйцевым мешком), науплиальные и копеподитные стадии *T. furcata* из массовых культур данного вида. Схематический
 15 рисунок самки *T. furcata* с яйцевым мешком (из WORMS <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=image&tid=365733&pic=82213>, Sars, 1905)

Способ реализуется следующим образом, от диких самок *T. furcata*, отловленных из природной популяции, получают первое поколение науплиев и при достижении ими половозрелости формируют маточное стадо культивируемых *T. furcata*. в возрасте 11-
 20 12 суток (при соотношении самцов к самкам не менее 1:4). При достижении половозрелости культуру, состоящую из самцов и самок (при высокой плотности для повышения успешности их копуляции) кормят смесью микроводорослей *Phaeodactylum tricornutum*, *Rhodomonas salina* с добавлением *Tetraselmis* в объемном соотношении культур 3:3:1 при слабой аэрации в световом режиме 12:12 ночь\день при освещенности 25 500 люкс), и подмене свежей стерилизованной морской воды в течение 3-х суток.

После завершения копуляции, самок с яйцевыми мешками перемещают в специальные резервуары и эксплуатируют в течение периода высокой плодовитости самок. Дважды в неделю в течение 15 сут производителей отделяют от науплиев гарпактицид, которых используют либо для дальнейшего выращивания когортной популяции, либо для
 30 кормления личинок на ранних стадиях развития.

Регулярное продуцирование науплиев самками *T. furcata* достигается оптимальными условиями копуляции самок и самцов, и содержания половозрелых самок при оптимальном кормлении в наиболее производительном возрасте. Дальнейшее выращивание последовательных жизненных стадий когортных групп науплиев
 35 обеспечивает регулярное и заранее рассчитанное получение количества (биомассы) копепод определенного возраста (размера).

В течение жизненного цикла *T. furcata* проходят 12 стадий развития, включающих 6 (шесть) науплиальных (личиночных, обозначаемых N1 - N6) (длиной от 60 до 180 мкм), 5 (пять) - копеподитных стадий (C1 - C5) и одну, последнюю, 12-ю жизненную стадию

40 - половозрелые *T. furcata* (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) на последнюю копеподитную стадию C6

45 (половозрелой особи), *T. furcata* достигают терминальных размеров тела (длиной самцов до 700 мкм, и самок до 950 мкм), и линек больше не происходит. В дальнейшем может происходить только прирост биомассы *T. furcata*, например, за счет отложения запасных веществ и/или формирования генеративной продукции (яиц). Сроки достижения (прохождения очередной линьки) каждой последующей стадии *T. furcata* обусловлены

эндогенными (запрограммированными генетически) механизмами процессов и зависят от комплекса модифицирующих их температурных и трофических условий. Оптимальные температурные условия для развития генерации находятся в пределах 15-25°C, при этом повышение температуры (при оптимальных трофических условиях) сокращает

- 5 длительность развития, время генерации и частоту производимых самкой кладок, но и длительность жизни (почти вдвое).

Размножение *T. furcata* половое, происходит путем копуляции мужского и женского организма, переноса самцом сперматофора к отверстию сперматеки самки, для последующего перехода и хранения спермы в сперматеке и использования для

- 10 оплодотворения зрелых ооцитов. Цикл размножения *T. furcata*, начиная с процесса спаривания, несколько отличается от других *Harpacticoida*. Самец в течение 0.5-1 час выбирает конкретную самку (согласно современным исследованиям, следуя аттрактивным феромонам самок) для копуляции, сближается с ней, и определяя их взаиморасположение, удерживает самку и занимает положение, обратное положению 15 самки под ее фуркой, прикрепляясь вверх ногами под брюшной стороной самок, используя для захвата максиллипеды. Копуляция может длиться от 12 до 24 часов, часто наблюдается между взрослыми самцами и неполовозрелыми самками, начиная с их V и даже с IV копеподитной стадии. Копуляция самца с неполовозрелыми самками продолжается более длительно, в процессе которой самка проходит линьку и дальнейшее 20 развитие до перехода к половозрелости на VI копеподитной стадии. Со взрослой самкой копуляция самцов может происходить в течение первой недели после достижения ею половозрелости. Самку к моменту достижения ею периода половозрелости легко определить по появлению так называемой "тигроидной" окраски, когда яйцеводы становятся темного цвета из-за того, что в созревших ооцитах последней стадии 25 откладывается темный пигмент.

Процесс копуляции завершается прикреплением сперматофора к сперматеке самки и переходом содержимого сперматофора в сперматеку. После начала копуляции прикрепленные самцы могут в течение достаточно длительного времени переносится самками, что объясняется феноменом так называемой посткопулятивной охраны

- 30 спаривания, которая интерпретируется как стратегия обеспечения отцовства и соответствует времени, необходимому для перемещения спермы из сперматофора в сперматеку самки. Одной из особенностей *T. furcata* является то, что самки после единственной копуляции могут длительный период сохранять в сперматеке сперму, и продуцировать оплодотворенные яйца в многочисленных последующих кладках.

- 35 Оплодотворение созревших ооцитов происходит при их передвижении по оотекам и прохождении непосредственно вблизи сперматеки. После оплодотворения происходит перемещение темных компактных оплодотворенных яиц в одинарный плотно-структуренный овальный яйцевой мешок, который из-за окраски яиц приобретает почти черный цвет, а самка *T. furcata* - до формирования новой порции зрелых ооцитов 40 в оотеке теряет свою "тигроидную" окраску.

На начальных этапах развития эмбрионов яйца имеют плотную структуру, и наполненный яйцевой мешок имеет уплощенно-овальную форму. В процессе эмбрионального развития (~через 12 часов) происходит трансформация пигментов, эмбрионы приобретают оранжевую окраску, яйца в яйцевом мешке гидратируются, и 45 меняют свою структуру на "шаровидную". Одновременно в яйцеводах самки происходит формирование новой порции зрелых темноокрашенных ооцитов, и самка снова приобретает "тигроидную" окраску. На поздних этапах развития структура эмбрионов *T. furcata* в яйцевом мешке становится прозрачной - на фоне полупрозрачных серовато-

окрашенных тканей зародыша различим появившийся ярко-красный пигмент, и в деструктуризованных яйцевых мешках происходит отделение эмбрионов друг от друга.

Самок после первой кладки легко отличить от созревших, но еще не

оплодотворенных: дистальные концы фурки первых оказываются как бы с

⁵ "приклеенными" остатками предыдущего ("освобожденного") яйцевого мешка. Как правило, последующие яйцевые мешки менее структурированы, чем начальные, а последние кладки обычно довольно асимметричны.

После разрыва оболочки яйца и вылупления науплии (N I) могут некоторое время оставаться неподвижными, прикрепленными к массе еще не вылупившихся яиц. Весь ¹⁰ процесс от появления оплодотворенных яиц в яйцевом мешке до начала вылупления науплиев занимает от 1 до 3 суток обратно пропорционально температуре в диапазоне 15-25°C. Частота кладок (временной интервал между последовательными порциями оплодотворенных ооцитов, перемещаемых в яйцевой мешок) также варьирует от 1 до 3 суток, в зависимости от температуры и концентрации пищи.

¹⁵ Величина первых нескольких кладок может варьировать от 20 до 86 яиц/яйцевой мешок, составляя в среднем 47 яиц/яйцевой мешок. При средней частоте кладок 2,5 сут⁻¹ в течение первых 10 сут составляет среднесуточную продукцию 28 науплиев/самку в сутки. Суммарная продукция науплиев самки *T. furcata* за активный репродуктивный ²⁰ период при оптимальных условиях достигает ~ 400 науплиев. После вылупления и отделения от яйцевых мешков, науплии N I имеют минимальную двигательную активность, прикрепляются под поверхностью воды, но после линьки и переходе на стадию N II науплии начинают спирально-поступательно передвигаться в толще воды. Время генерации, т.е. от вылупления N I, развития до половозрелости, копуляции, и ²⁵ получения N I второго поколения (генерации) составляет в среднем от 12 (при 22±1°C) до 30 сут (при 17±1°C), и может дополнительно варьировать в зависимости от плотности копепод и пищевой обеспеченности.

Средняя выживаемость *Tisbe furcata* до половозрелости за время генерации варьирует от 28 до 76% (в среднем 56%) и вариации соотношения самка/хамец от 1,2 (при высокой) ³⁰ до 0,5 (при низкой выживаемости), а выживаемость положительно коррелирует с трофическими условиями. В течение своего жизненного цикла *Tisbe furcata* проходит шесть науплиальных и шесть копеподитных стадий, последней из которых (VI) является взрослая особь; возрастные стадии разделены одной линькой. Длина половозрелой самки - в среднем ~ 0,900 мм, но может достигать 1,0 мм, а самца - 0,7 мм. Как и у других гарпактикоидных копепод, самка *Tisbe furcata* вынашивает яйца в одном яйцевом мешке, ³⁵ прикрепленном к генитальному сегменту.

Процесс питания копепод *Tisbe furcata* характерен для избирательных хищников: отбор и хватание пищевых частиц происходит с использованием конечностей (антенны 2 и максиллы-2), перемещением пищи по направлению к ротовому выступу с помощью максиллипеды и максиллы-2, а перемалывание пищи с помощью мандибул, при этом ⁴⁰ отторжение пищи может происходить даже после ее первичной обработки (Marcotte, 1977).

Реакции избегания хищников начинают проявляться у *Tisbe* только на III копеподитной (СШ) стадии (незначительно), и значительно возрастают от V ⁴⁵ копеподитной (CV) к VI (половозрелой, CVI), когда скорость движения *Tisbe* может превышать 20 см/сек. Таким образом, все стадии развития *Tisbe* от N I до CIV благодаря своим размерам (табл.) и этиологии доступны для ранних личинок рыб с 3 по 15 день (наиболее критический период развития по выживаемости), когда личинки не могут поймать быстро избегающую жертву - копепод. Поздние копеподиты (V) и взрослые

стадии могут быть пойманы более поздними личинками рыб с развитой нервно-мышечной системой и усовершенствованным ротовым аппаратом после прохождения критической стадии метаморфоза и к окончанию миграции глаз (Khanaychenko et al., 1994; Ханайченко, Гирагосов, 2021).

⁵ Пример реализации способа

Выделение в культуру взрослых *Tisbe furcata*

Исходные живые дикие особи *Tisbe furcata* были получены при смывах с макрофитов, собранных в прибрежной зоне Севастопольской бухты Черного моря, и доставленных в лабораторию. Живых интактных половозрелых самок с яйцевыми мешками *Tisbe*

¹⁰ *furcata* (Фиг. 1) селекционировали из проб, выдерживали в дезинфекционном растворе, промывали стерильной морской водой и помещали в выростную емкость, в которую добавляли стерилизованную морскую воду с кормовыми микроводорослями, собранными из массовых культур в экспоненциальной фазе, количество которых корректировали в соответствии со скоростью их выедания копеподами. Полученные ¹⁵ от самок *Tisbe furcata* науплии служили «маточным стадом» *T. furcata*, которые в дальнейшем служили для получения массовой культуры *T. furcata*. «Маточное стадо» *T. furcata* с половозрелыми оплодотворенными самками с заполненными сперматеками в возрасте 15 суток помещали в емкость, снаженную мягкой продувкой воздухом (не более 500 мл/мин) со слабым освещением (~ 500 люкс) сбоку в режиме ~ 12:12 день: ²⁰ ночь, и ежедневной подмене 1/10 объема свежей стерилизованной морской воды в течение 3 суток.

Минимум 10 (20) самок с яйцевыми мешками собирали из живой пробы пипетированием, промывали дезинфекционным раствором и рассаживали индивидуально по бюксам с 50 мл стерильной морской водой с добавлением микроводорослей. В ²⁵ течение последующих 7 суток получали науплиальные стадии от разных самок, проводили подсчет плодовитости самок и выживаемости науплиев, сравнивали производственные показатели, и на более поздней стадии науплиев из наиболее производительных партий отделяли от самок путем концентрации на свет и отделением через сита 150/40 мкм, и пересаживали при исходной плотности в 500 мл емкости из ³⁰ расчета около 20 науплиев/мл стерильной морской воды, добавляя смесь микроводорослей *Isochrysis galbana* и *Phaeodactylum tricornutum* (~ 10^5 кл/мл), и продолжали выращивать гарпактицид до половозрелости в течение 12 суток (с выживаемостью не менее 65% от науплиев до половозрелых особей), после чего производили временное сгущение культуры для повышения вероятности спаривания самцов и самок и получения ³⁵ максимально возможного количества оплодотворенных самок.

Получение массы науплиев

Производителей *Tisbe furcata* для массовой культуры (при доле самок с яйцевыми мешками не менее 1000 экз) промывали стерилизационным раствором и помещали в ⁴⁰ цилиндры с площадью сечения около 350 см² и высотой более 15 см (не более 25 см) с натянутой снизу каркасной сеткой с ячейй 200 мкм, предотвращающей проход через нее взрослых особей. Цилиндр с гарпактицидами погружали до 15 см уровня воды в прозрачный цилиндро-конический инкубатор общим объемом 12 л, наполненным стерильной морской водой уровнем до 25 см с добавлением смеси микроводорослей *Rhodomonas* sp. и *Phaeodactylum tricornutum* при общей концентрации клеток не менее ⁴⁵ 10^5 /мл. Перемешивание среды обеспечивалось мягкой продувкой снизу, температуру поддерживали в пределах 22±1°C. Ежесуточно промывали сверху цилиндры со взрослыми гарпактицидами, приподнимая их на каркасной сетке и смывая стерильной

водой вылупившихся из яйцевых мешков науплиев, проходящих через сито с ячеей 200 мкм в толще водной массы. При этом около дна прозрачного инкубатора помещали источник света, и проверяли наличие науплиев, концентрирующихся по направлению к источнику света. При регистрации массового появления науплиев в толще воды,

- 5 цилиндр с производителями (после смыва науплиев в воду первого инкубатора) переносили аккуратно в следующий прозрачный цилиндрико-конический инкубатор с добавлением микроводорослей, и через 2 суток производили аналогичные манипуляции. Эксплуатацию маточной культуры, содержащей оплодотворенных самок, регулярно производящих яйцевые мешки, производили на протяжении 10-12 суток (до возраста 10 самок не более 24-26 сут), после чего заменяли ее на подготовленную новую когорту производителей, полученных из первых партий науплиев. [Длительность эксплуатации производителей ~ равна длительности взросления (достижения половозрелости) первых партий, произведенных ими науплиев].

В цилиндрико-коническом 10-15 л инкубаторе, из которого изымали производителей в 15 цилиндре на каркасной сетке, проводили выращивание когортной партии науплиев в постепенно увеличивающемся объеме при ежедневном добавлении новой порции микроводорослей *Isochrysis galbana* для ранних науплиальных стадий с добавлением *Phaeodactylum tricornutum* и *Tetraselmis suecica* при переходе к копеподитным стадиям, и добавлением *Rhodomonas sp.* при достижении половозрелости.

- 20 Таким образом, в среднем, в одном 15 л инкубаторе получали в сутки ~ 20000 науплиев, что составляло за период эксплуатации одного поколения производителей ~ 240 тыс. науплиев. При выживаемости за период генерации науплиев из одного инкубатора получали ~12,8 тыс. половозрелых *Tisbe furcata*, которых использовали либо для обновления эксплуатируемого стада производителей в 15 л объеме, либо для 25 апгрейда (увеличения объема производства в больших объемах) эксплуатируемой части культуры.

При необходимости цилиндры с производителями с сеткой 200 мкм помещали в плавучем состоянии на поверхности выростных бассейнов для личинок, и регулярно орошали их стерильной морской водой для смыва производимых науплиев 30 непосредственно в среду с личинками.

- 35 Предлагаемый способ был успешно апробирован для кормления личинок камбалы калкан при выращивании их в пилотных установках ИнБЮМ, 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 исключительно солоноватоводными коловратками и артемиями.

Таблица 1. Технологические характеристики получения разных возрастных стадий (когорт) *Tisbe furcata* при температурном режиме 20 °C

Стадия развития	Длина общая (мкм)	Возраст (сут)	Максимальная плотность (экз/мл)	Корм (кл/мл) (разные микроводорослей)
науплий N1	50-60	1	10	10^2
науплий N2	75-85	2	9	10^4
науплий N3	95-105	3	8	10^4
науплий N4	120-130	3	7	$5 \cdot 10^4$
науплий N5	145-155	4	6	$5 \cdot 10^4$
науплий N6	170-180	5	5	$5 \cdot 10^4$
copepodite C1	190-200	6	5	$5 \cdot 10^4$
copepodite C2	240-250	7	4	$5 \cdot 10^4$
copepodite C3	350-360	8	3	$5 \cdot 10^4$
copepodite C4	425-450	9	3	$5 \cdot 10^4$
copepodite C5	430-460	10	2	$5 \cdot 10^4$
copepodite C6	670-900	11	1	$5 \cdot 10^4$

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 питается (отфильтровывают) копеподы находится в прямой пропорциональной зависимости от размера возрастной стадии копепод.

По истечении продукционного цикла (оптимум 15 суток при температуре 20-22°C), культиватор сливают, дезинфицируют, промывают и готовят к новому продукционному циклу. Когорта половозрелых оплодотворенных самок в возрасте 14-15 сут может быть использована для дальнейшей эскалации культуры (для производства науплиев).

Преимущества гарпактицид по сравнению с каланоидными копеподами (например, акария). Гарпактициды вынашивают яйца до выклева науплиев в яйцевом мешке, что, соответственно, повышает выживаемость в процессе развития от яиц к науплиям.

...Ранние науплиальные стадии, во-первых, более соответствуют размерам рта самых ранних личинок, во-вторых, скорость их передвижения ниже, что позволяет ранним личинкам рыб легко преследовать их, и частота поимки данного вида живого корма приводит к более активному метаболизму личинок. Преимущество культивирования гарпактикоидных копепод по сравнению с каланоидными копеподами - заниженные требования к объемам культивирования и к количеству используемой воды.

Биологические особенности гарпактикоидных копепод позволяют их содержать при высоких плотностях, не снижая скорость размножения, они могут выдерживать высокую скорость протока воды, их не вымывает из системы выращивания. *Tisbe furcata* представляет собой живой корм для личинок морских рыб, альтернативный коловраткам *Brachionus plicatilis* и науплиям артемии *Artemia salina*. Преимущество применения *Tisbe*

furcata по сравнению с коловратками и артемиями (или в дополнение к ним) заключается в том, что при питании этим живым кормом, содержание и состав незаменимых компонентов, в котором больше соответствует потребностям ранних пелагических личинок морских рыб, улучшается их выживаемость, пигментация и снижается количество морфологических аномалий в процессе развития. Помимо этого, гарпактикоидные копеподы оказывают положительное влияние на среду выращивания личинок, а именно, в отличие от коловраток, численность гарпактикоидных копепод в системе выращивания не возрастает логарифмически и при внесении более ранних стадий, последние, будучи не съеденными, постепенно вырастают одновременно с личинками, постоянно соответствуя размерному оптимуму живого корма для подросших личинок рыб. Напротив, биологические особенности питания *T. furcata* на разных стадиях развития позволяют этому организму производить (копеподитные стадии) как очистку обрастаний поверхностей выростных бассейнов, так и (науплиальные стадии) элиминировать нежелательные организмы, населяющие поверхностную пленку. Помимо этого, взрослые и поздние копеподитные стадии *T. furcata* могут питаться помимо микроводорослей, мелкими инфузориями, также улучшая состояние водной среды выростных бассейнов. Липидный и, в частности, жирнокислотный, состав *T. furcata* полностью соответствует биохимическим потребностям личинок морских рыб: содержание фосфолипидов - 48-58%; ЭПК - 12%; ДГК - 22-27%; ДГК/ЭПК - 1.9-2.3 (Parrish et al., 2012). ДГК - докозагексаеновая жирная кислота, входящая в состав нервной ткани позвоночных животных, особенно необходима для выживаемости, развития глаз и пигментации у личинок пелагических рыб; в частности, камбалообразных. Впервые культура *Tisbe furcata* в ИнБЮМ была получена в 1992 г., и разные стадии развития *T. furcata* из массовых культур использовали для экспериментов по кормлению личинок калкана в возрасте от 5 до 25 сут, начиная с 1992-1993 гг.(Khanaichenko et al., 1994). Науплиальные стадии *T. furcata* составляли 20-25% среди пищевых объектов в кишечниках личинок калкана в возрасте 5-суг, и 10% у 10-сугочных личинок, у которых находили до 75% копеподитов *T. furcata* при их невысокой (25%) доле в среде, что свидетельствовало о высоком индексе избирательности гарпактицид (Ханайченко, Битюкова, 1999).

Источники информации, принятые во внимание

Новоселова Н.В., Каниева Н. А. 2020. Культивирование морского зоопланктона в поликультуре. Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство, (1), 118-130. DOI: 10.24143/2073-5529-2020-1-118-130.

Ханайченко А.Н. Питание и продуцирование коловраток в экспериментальных популяциях при комбинированном воздействии температуры и трофических условий. Автореферат на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Минск, 1988. 24 с.

Ханайченко А.Н., Битюкова Ю.Е. 1999. Избирательность питания личинок калкана и выбор стратегии их кормления. Экология моря. 48: 63-67. Ханайченко А.Н., Гирагосов В.Е. 2021. Монография. 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>

Abu-Rezq, T.S., Yule, A.B., and Teng, S.K. 1997. Ingestion, fecundity, growth rates and culture of the harpacticoid copepod, *Tisbe furcata*, in the laboratory. *Hydrobiologia* 347:109-118.

Devauchelle B, Girin M. 1974. Production du rotifere *Brachionus plicatilis* O.F. Miiller en levage mixte avec le copepode *Tisbe furcata* (Baird). Publ. Cent. Nat. Explor. Oceans Colloque

sur l'aquaculture. Pubis CNEXO (Actes de Colloques) 1: 87-99.

Drillet, G., Frouel, S., Sichlau, M. H., Jepsen, P. M., Hojgaard, J. K., Joarder, A. K., & Hansen, B. W. 2011. Status and recommendations on marine copepod cultivation for use as live feed. Aquaculture, 315 (3-4), 155-166.

⁵ Heath, S.P., and C.G. Moore. 1997. Rearing Dover sole larvae on Tisbe and Artemia diets. Aquaculture International 5: 29-39.

Khanaichenko A.N., Bityukova Y.E., Tkachenko N.K. 1994. Experiences in rearing endemic Black Sea turbot larvae. In: P. Lavens & R.A.M. Remmerswaal (Eds.). Turbot culture: problems and prospects. EAS Spec.Publ. No 22: 349 - 358. Khanaichenko A.N., Kolesnikova E.V. Tisbe

¹⁰ furcata (Harpacticoida) cultivation a live food for fish larvae. Proc. Sixth International Conference on Copepoda, 1996. Oldenburg, Germany: 70-71.

Nanton, D. A., & Castell, J. D. (1998). The effects of dietary fatty acids on the fatty acid composition of the harpacticoid copepod, Tisbe sp., for use as a live food for marine fish larvae. Aquaculture, 763(3-4), 251-261.

¹⁵ Norsker, N.H., and J.G. Stotstrup. 1994. The importance of dietary HUFA's for fecundity and HUFA content in the harpacticoid Tisbe holothuriae Humes. Aquaculture 125: 155-166. The harpacticoid copepod Tisbe spp. are able to synthesize essential fatty acids (EFA) like EPA and DHA from short-chain fatty acids, even when fed with EFA-deficient microalgae and yeast Marcotte, B. M. (1977). An introduction to the architecture and kinematics of harpacticoid

²⁰ (Copepoda) feeding: Tisbe furcata (Baird, 1837). Mikrofauna Meeresboden, 61, 183-196.

Parrish C.C, V.M. French and M. J. Whiticar. 2012. Lipid class and fatty acid composition of copepods (*Calanus finmarchicus*, *C. glacialis*, *Pseudocalanus* sp., *Tisbe furcata* and *Nitokra lacustris*) fed various combinations of autotrophic and heterotrophic protists. J Plankton Res. 34 (5): 356-375.

²⁵ Ribeiro AC, Souza-Santos LP. 2013. Mass culture of the harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis* fed inert diets. Blue Biotechnology Journal. 1;2(4):583. Rieper M, Flotow C. 1981. Feeding experiments with bacteria, ciliates and harpacticoid copepods. Kieler Meeresforschungen-Sonderheft.5:370-5.

³⁰ Stotstrup J.G. 2003. Production and nutritional value of copepods. Live feeds in marine aquaculture, 145-205.

Wang, K., Li, K., Shao, J., Hu, W., Li, M., Yang, W.,... & Lin, Q. 2017. Yeast and corn flour supplement to enhance large-scale culture efficiency of marine copepod *Tisbe furcata*, a potential live food for fish larvae. Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh, 69.

³⁵ (57) Формула изобретения

Способ культивирования морских гарпактиоидных копепод *Tisbe furcata* - живых кормов для личинок ценных морских рыб, включающий отлов особей из природной популяции, формирование маточного стада, отличающийся тем, что от диких самок *T. furcata* из природной популяции получают первое поколение науплиев и при достижении

⁴⁰ ими половой зрелости формируют маточное стадо *Tisbe furcata* в возрасте 11-12 суток при соотношении самцов к самкам не менее 1:4, для повышения эффективности их копуляции, которых кормят смесью микроводорослей *Phaeodactylum tricornutum*, *Rhodomonas salina* с добавлением *Tetraselmis* в объемном соотношении культур 3:3:1,

⁴⁵ содержат при слабой аэрации и световом режиме 12:12 ч ночь : день, при освещенности 500 люкс и ежедневной подмене 1/10 объема свежей стерилизованной морской водой в течение 3 суток, затем отделяют самок с яйцевыми мешками и помещают в резервуары со стерильной морской водой с добавлением микроводорослей и в течение 15 суток 2 раза в неделю отделяют от производителей науплиев гарпактиоид, которых используют

для кормления личинок на ранних стадиях развития, а для дальнейшего выращивания когортной популяции вновь отделяют науплиев от самок путем концентрации на свет и отделением через сито, пересаживают в емкости со стерильной морской водой,

⁵ добавляют смесь микроводорослей *Isochrysis galbana* и *Phaeodactylum tricornutum* ~ 10^5 кл/мл, продолжая выращивать гарпактицид до половозрелости в течение 12 суток, при температуре 15-25°C, при ежедневном добавлении микроводорослей *Isochrysis galbana* для ранних науплиальных стадий, с добавлением *Phaeodactylum tricornutum* и *Tetraselmis suecica* при переходе к копеподитным стадиям, и добавлением *Rhodomonas* sp. при достижении половозрелости, до возраста самок не более 24-26 суток, после чего ¹⁰ заменяют на подготовленную новую когорту производителей, полученных из первых партий науплиев.

15

20

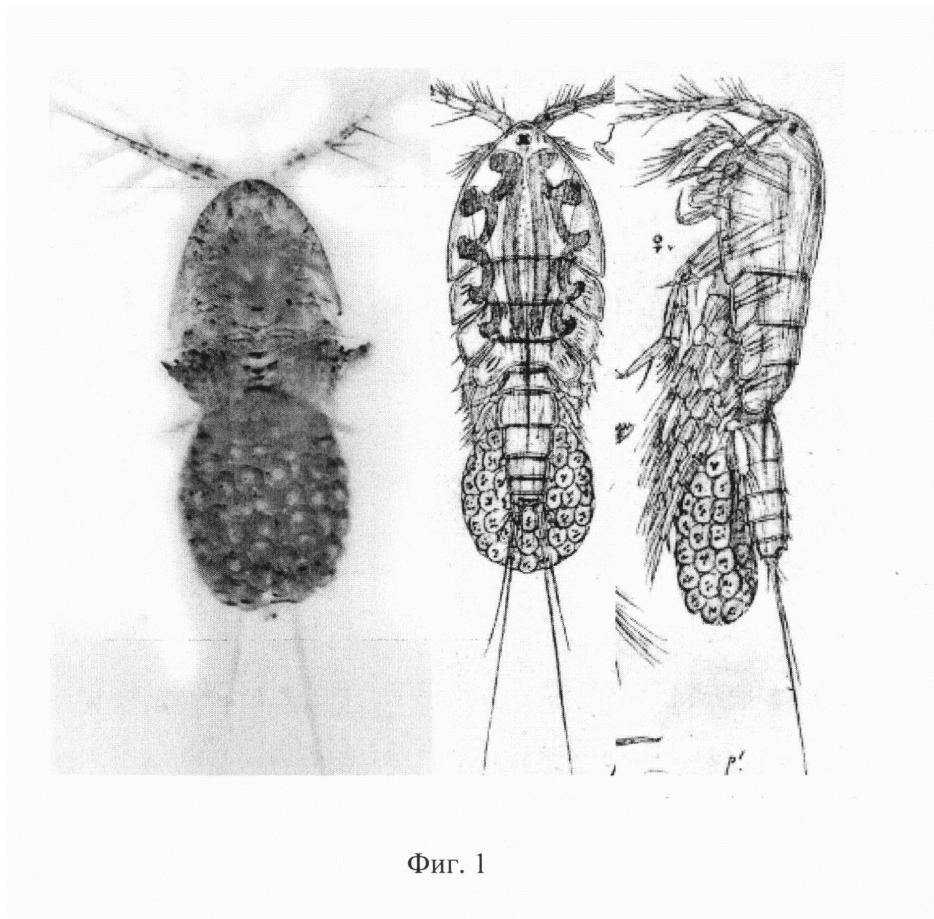
25

30

35

40

45



Фиг. 1