



СОЮЗ СОВЕТСКИХ  
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ  
РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) 1738186A1

(51)5 A 01 K 61/00

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ  
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ  
ПРИ ГКНТ СССР

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

1

- (21) 4813763/13  
(22) 05.02.90  
(46) 07.06.92. Бюл. № 21  
(71) Институт зоологии АН КазССР  
(72) К. А. Бапиев, А. И. Корнелюк, И. Н. Магда  
и В. В. Тищенко  
(53) 539.36(088.8)  
(56) Поликарпов Г. Г. Международный референ-  
тный центр "Артемия". - Гидробиол. ж-  
л., 1984, т. 230, вып. 6, с. 94-95.

Lawens P., Tackaert W., Sorgelxoos P.  
International study on Artemia XVI. Influence  
of culture conditions and specific diapause  
deactivation methods on the hatchability of  
Artemia cysts produced in a standard culture  
system /Mar. Ecol. Progr. Ser, 1986, V. 31, №  
2, p. 197-203.

Изобретение относится к биотехнологии, преимущественно рыбного хозяйства, и может быть использовано для получения науплиусов в эмбриональной оболочке, с максимальным содержанием питательных веществ, в качестве корма для молоди ценных пород рыб.

Интерес к жаброногим рачкам *Artemia* sp. вызван тем, что науплиусы, вышедшие из цист, являются прекрасным стартовым кормом для молоди ценных пород рыб. Кроме того, из науплиусов можно получать биологически активные соединения, необходимые для фармакологии и пищевой промышленности. Науплиусы в момент вылупления содержат 25% жирных кислот от общего веса. Однако ценность науплиусов в качестве стартового корма значительно уменьшается после их выхода из эмбриональной оболочки. Обусловлено это тем, что первые два дня после вылупления свободно плавающие науплии не нуждаются в пище,

2

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ НАУПЛИУСОВ  
АРТЕМИИ В ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ОБОЛОЧ-  
КЕ

(57) Использование: получение науплиусов артемии в эмбриональной оболочке в качестве живого корма для молоди рыб при искусственном выращивании. Сущность изобретения: инкубацию цист артемии проводят в забуференном растворе хлорида натрия на дистиллированной воде с добавлением в него ферроцианида калия до концентрации  $10^{-4}$  М. 3 табл.

обходясь собственными запасами. Это приводит к снижению содержания жирнокислотного состава рачков до 10-15% от общей массы тела. Вышеуказанную проблему можно было бы избежать, если бы инкубируемая партия цист артемии вылуплялась одновременно. Однако, известные в настоящее время способы стимуляции (температура, забуференность среды инкубации, аэрация, обязательное присутствие в среде раствора хлорида натрия в диапазоне 3-10%) выклева науплиусов из цист артемии не дают возможность получения рачков с максимальным содержанием запасенных питательных веществ, так и 100% выхода науплиусов. Максимальный выход составляет: 60-70% на 24 ч инкубации и 80-95% на 48 ч. Это происходит в результате неодновременности созревания эмбрионов и выклева науплиусов из цист инкубируемой партии. Даже при соблюдении перечисленных условий стимуляции выклева науплиу-

сов из цист продолжается 6-7 ч при 24-часовой инкубации, а при 48-часовой – 30+31 ч. Это соответственно приводит к снижению пищевой ценности науплиусов.

Известен способ получения науплиусов путем химической декапсуляции цист артемии раствором гипохлорита натрия. Околоплодная стенка цист (хорион) разжижается посредством замачивания сухих цист в растворе гипохлорита натрия (0,8% гипохлорит, 0,32 М NaOH, 48 мМ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) в течение 1,5 ч при 23°C и слабом перемешивании. Когда шероховатая часть стенок цист удаляется (оценивается по степени окрашивания раствора (среды инкубации) в оранжевый цвет), цисты промывают 10+12 раз водой, с последующей одноразовой промывкой цист в растворе 25 мМ HCl и 0,2 NaCl. В дальнейшем цисты помещают на ночь в 2,0%-ный раствор NaCl при 4°C. После этого, повторно промывают цисты дистиллированной H<sub>2</sub>O и собирают с помощью фильтра. Собранные цисты помещают в раствор сахарозы (0,25 М), содержащий твин 80 (0,1%), и разрывают капсулу цист посредством перемешивания среды с помощью магнитной мешалки при 0°C в течение 20,5+3,0 ч (при соотношении цист к объему : 10 г + 100 мл).

Таким образом, для получения науплиусов путем химической декапсуляции цист артемии необходима обязательная последовательность технических приемов: 1) приготовление раствора гипохлорита натрия, внесение в нее цист и инкубация при постоянной температуре; 2) определение времени удаления шероховатой поверхности стенок цист, проводимое по степени окрашивания среды инкубации; 3) промывка (до 10–12 раз) водой цист от раствора гипохлорита натрия; 4) приготовление раствора 25 мМ HCl, 0,2%-го NaCl и разовая промывка ею цист артемии; 5) инкубация цист в 2%-ном растворе NaCl при 4°C в течение 16–17 ч; 6) промывка дистиллированной H<sub>2</sub>O и сбор цист с использованием фильтра; 7) приготовление раствора сахарозы (0,25 М), содержащий твин 80 (0,1%), внесение в него цист артемии с последующим перемешиванием, используя при этом магнитную мешалку при 0°C, которая приводит к разрыву капсулы и выходу науплиусов в эмбриональной оболочке (длительность перемешивания зависит от соотношения веса цист к объему)

Однако известный способ получения науплиусов в эмбриональной оболочке из цист артемии не лишен недостатков. Во-первых, гипохлорит натрия – сильный оксидант и взаимодействует с липидами и белками, разрушая их. Время реакции гипохлорита натрия (концентрированного) составляет примерно 8 мин. Нетрудно оценить время взаимодействия гипохлорита натрия непосредственно с эмбрионом, лишенным хориона. К тому же, время взаимодействия раствора гипохлорита натрия с поверхностью цист оценивается визуально по степени окрашивания в оранжевый цвет среды инкубации и зависит от соотношения количества цист к объему жидкости. Во-вторых, даже после стимуляции выклева, выход науплиусов из цист растягивается от 6–7 ч до 30–31 ч, т.е. остается неоднозначность развития эмбрионов артемии от времени инкубации. В связи с этим декапсуляция гипохлоритом натрия цист артемии приводит к получению неоднородных по степени созревания декапсулированных науплиусов и соответственно по содержанию в них количества и качества питательных веществ.

Целью изобретения является упрощение способа получения науплиусов в эмбриональной оболочке из цист артемии. Поставленная цель достигается тем, что согласно известному способу декапсуляции цист артемии, включающему операции приготовления декапсулирующего раствора, его внесение для проведения декапсуляции цист, оценки времени реакции раствора гипохлорита натрия с поверхностью цист; промывку водой цист от раствора гипохлорита натрия; приготовление раствора, содержащего 0,2% NaCl, 25 мМ HCl и промывка им цист артемии; промывка цист дистиллированной H<sub>2</sub>O и сбор их с использованием фильтра; приготовление раствора сахарозы (0,25 М) с твином 80 (0,1%) и инкубация в нем цист с использованием магнитной мешалки для перемешивания при 0°C, для разрыва капсулы исключают.

Для достижения поставленной цели цисты артемии инкубируют в забуференном растворе хлорида натрия, приготовленном на дистиллированной H<sub>2</sub>O при 20–22°C, с добавлением в среду для стимуляции процесса эмбриогенеза раствор ферроцианида калия (10<sup>-4</sup> М). Инкубирование цист артемии в забуференном растворе хлорида натрия с добавлением в среду ферроцианида калия стимулирует эмбриональное развитие, выклев и отделение от капсулы полностью сформировавшихся науплиусов в эмбриональной оболочке и, с последующей, до четырех часов задержкой появления свободно плавающих науплиев.

Использование для стимуляции эмбриогенеза – продувка среды воздухом не дает требуемого эффекта – получения науплиусов в эмбриональной оболочке. Это связано, во-первых, с максимальной активацией

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55

обменных процессов в эмбрионе, что приводит к минимальному по времени наличия стадии науплиусов в эмбриональной оболочке. Во-вторых, постоянное перемешивание среды инкубации за счет продувки воздухом приводит к механическому разрыву эмбриональной оболочки, что в свою очередь не дает возможность фиксировать наличие фазы (стадии) – науплиусов в эмбриональной оболочке.

**Пример.** Замачивание и инкубирование цист в солевом (NaCl – 5%) забуференном (рН 8.0) растворе проводилось по общепринятой методике, в соотношении навески цист к объему среды – 1 мг:2 мл, соответственно.

Объектом исследования были цисты *Artemia sp.*

**Пример 1.** Выход свободно плавающих науплиев и или полностью сформировавшихся науплиев в эмбриональной оболочке, инкубируемых в растворе хлористого натрия, приготовленного на водопроводной и дистиллированной H<sub>2</sub>O в зависимости от температуры и времени инкубации представлены в табл. 1.

а) Среда инкубации приготовлена на водопроводной H<sub>2</sub>O. Как видно из данных, представленных в табл. 1, при инкубации в солевом растворе, приготовленном на водопроводной H<sub>2</sub>O, выклевались только свободно плавающие науплии и не отмечалось выклева науплиусов в эмбриональной оболочке. Процент выхода науплиусов зависит от температуры. Максимальный выход науплиусов данной популяции от температуры 22°C и выше.

б) Среда инкубации приготовлена на дистиллированной H<sub>2</sub>O. Как видно из табл. 1, при инкубации в солевом растворе на дистиллированной H<sub>2</sub>O происходит выход науплиев в эмбриональной оболочке из капсулы. Оптимальный диапазон температуры находится в пределах 20–22°C. Ниже 20° умень-

шается процент выхода науплиев в эмбриональной оболочке, выше 22°C параллельно с выходом науплиев в эмбриональной оболочке, появляются свободно плавающие науплии.

**Пример 2.** Стимуляция развития эмбриогенеза добавлением в среду инкубации раствора ферроцианида калия представлена в табл. 2 и 3.

В примере 1 определен оптимальный температурный режим выхода свободно плавающих науплиусов и науплиусов в эмбриональной оболочке (t = 20 – 22°C). Поэтому, в данном пункте мы приводим примеры по стимуляции эмбриогенеза при оптимальной температуре 22°C.

а) Среда инкубации приготовлена на водопроводной H<sub>2</sub>O. Как видно из табл. 2, процент выхода свободно плавающих науплиусов увеличивается в среде с ферроцианидом калия от 5 до 15%. Максимальный эффект стимуляции выклева науплиусов достигается при концентрации  $K_4[Fe(CN)_6] = 10^{-4}$  М.

б) Среда инкубации приготовлена на дистиллированной H<sub>2</sub>O. Как видно из табл. 3 процент выхода науплиев в эмбриональной оболочке также увеличивается в среде, содержащей ферроцианид калия от 5 до 18%. Максимальный эффект стимуляции эмбриогенеза достигается при концентрации  $K_4[Fe(CN)_6]$ , равной  $10^{-4}$  М.

#### Формула изобретения

Способ получения науплиусов артемии в эмбриональной оболочке, предусматривающий инкубацию цист артемии в забуференном растворе хлорида натрия и последующее изъятие науплиусов, отличающийся тем, что, с целью упрощения способа, в качестве растворителя хлорида натрия используют дистиллированную воду, дополнительно в раствор вводят ферроцианид калия до концентрации  $10^{-4}$  М, а инкубацию цист проводят при 20–22°C в течение 24–48 ч.

Таблица 1

Температура инкубации, °C		Время инкубации, ч							
		20		24		25		48	
		с.п.н.*	н.вэ.о.*	с.п.н.	н.вэ.о.	с.п.н.	н.вэ.о.	с.п.н.	н.вэ.о.
19	а) водопроводная	15	-	35	-	50	-	75	-
	б) дистиллированная	-	12,5	-	32,5	-	35	35	42,5
20	а) водопроводная	20	-	42,5	-	55	-	85	-

Продолжение табл. 1

Температура инкубации, °C		Время инкубации, ч							
		20		24		25		48	
		с.п.н.*	н.вэ.о.**	с.п.н.	н.вэ.о.	с.п.н.	н.вэ.о.	с.п.н.	н.вэ.о.
20	б) дистиллированная	-	42,5	-	60	12,5	60	45	42,5
22	а) водопроводная	45	-	62,5	-	72,5	-	92,5	-
	б) дистиллированная	-	42,5	-	62,5	12,5	42,5	55	32,5
23	а) водопроводная	52,5	-	67,5	-	72,5	-	92,5	-
	б) дистиллированная	22,5	32,5	65	12,5	75	-	92,5	-

Таблица 2

Температура инкубации 22°C		Время инкубации, ч							
		20		24		25		48	
		с.п.н.*	н.вэ.о.**	с.п.н.	н.вэ.о.	с.п.н.	н.вэ.о.	с.п.н.	н.вэ.о.
контроль		45	-	62,5	-	72,5	-	92,5	-
K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]10 <sup>-6</sup> М		45	-	62,0	-	72,0	-	93	-
K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]10 <sup>-5</sup> М		50	-	65	-	77	-	95	-
K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]10 <sup>-4</sup> М		59	-	75	-	85	-	95	-
K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]10 <sup>-3</sup> М		40	-	60	-	78	-	93	-

\* с.п.н. - свободно плавающие науплиусы

\*\* н.вэ.о. - науплиусы в эмбриональной оболочке

Таблица 3

Температура инкубации 22°C		Время инкубации, ч							
		20		24		25		48	
		с.п.н.*	н.вэ.о.**	с.п.н.	н.вэ.о.	с.п.н.	н.вэ.о.	с.п.н.	н.вэ.о.
контроль		-	42,5	-	62,5	12,5	42,5	55	32,5
K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]10 <sup>-6</sup> М		-	43	-	64	15	42	55	33
K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]10 <sup>-5</sup> М		-	47	-	70	20	55	60	23
K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]10 <sup>-4</sup> М		-	53	-	75	20	60	50	20
K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]10 <sup>-3</sup> М		-	44	-	65	18	49	58	23

\* с.п.н. - свободно плавающие науплиусы

\*\* н.вэ.о. - науплии в эмбриональной оболочке