



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Государственная регистрация изобретения осуществлена по заявлению о признании действия исключительного права на территории Российской Федерации на основании статьи 13¹ Федерального закона от 18 декабря 2006 года № 231-ФЗ «О введении в действие части четвертой Гражданского кодекса Российской Федерации»

(21)(22) Заявка: 2014150173/93, 01.10.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
01.07.2004

Приоритет(ы):

Дата приоритета: 01.07.2004

Патент № 79254 (UA)

(45) Опубликовано: 10.02.2015 Бюл. № 4

Адрес для переписки:

299011, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2,
Институт биологии южных морей
им. А.О. Ковалевского

(72) Автор(ы):

Ханайченко Антонина Михайловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Институт биологии южных морей им. А.О.
Ковалевского (RU)

(54) СПОСОБ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КАЛАНОВИДНЫХ КОПЕПОД *CALANUS EUXINUS* (ЧЕРНОМОРСКОГО КАЛЯНУСА)

(57) Реферат:

Способ культивирования каланоидных копепод *Calanus euxinus* (черноморского калянуса) относится к области морской аквакультуры и может быть использован для проведения экспериментальных работ по морской биологии, физиологии и биохимии и для биологического тестирования в области морской токсикологии, а также при выращивании личинок ценных морских рыб.

В способе, отловленных из природных условий самок калянуса выдерживают в дезинфекционном растворе при температуре 15°C в течение 1,5 часов с добавлением микроводорослей *Euxyiaella cordata*, после чего осуществляют процедуру подготовки для синхронизации массовой получения яиц, получают синхронную массовую продукцию яиц, из которых производят синхронный выклев науплиев и получают

синхронные возрастные когорты калянуса.

Преимущества способа заключаются в том, что впервые предложены оптимальные температурные, трофические и плотностные условия для синхронизации и стандартизации процессов продуцирования яиц самками калянусов, развития и выклева яиц калянусов, развития и роста молоди калянусов до достижения последней жизненной стадии. Проведение дезинфекции яиц позволяет освободиться от патогенных микроорганизмов, влияющих как на выживаемость самих калянусов, так и при использовании их в качестве живых кормов на выживаемость личинок рыб. Предлагаемый способ позволяет осуществлять предварительную оценку количества и качества получаемого материала.

RU 2 541 458 C 1

RU 2 541 458 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

State registration of the invention has been provided following a request to recognize the exclusive rights on the territory of the Russian Federation as provided for in the Article 13¹ of the Federal Law of December 18, 2006 № 231-ФЗ «On enactment of part four of the Civil Code of the Russian Federation»

(21)(22) Application: **2014150173/93, 01.10.2014**(24) Effective date for property rights:
01.07.2004

Priority:

Priority date: **01.07.2004**Patent No. **79254 (UA)**(45) Date of publication: **10.02.2015** Bull. № 4

Mail address:

**299011, g. Sevastopol', pr. Nakhimova, 2, Institut
biologii juzhnykh morej
im. A.O. Kovalevskogo**

(72) Inventor(s):

Khanajchenko Antonina Mikhajlovna (RU)

(73) Proprietor(s):

**Institut biologii juzhnykh morej im. A.O.
Kovalevskogo (RU)**

(54) **METHOD FOR CULTURING CALANOID COPEPODS CALANUS EUXINUS (BLACK SEA CALANUS)**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: method for culturing calanoid copepods *Calanus euxinus* (Black Sea calanus) refers to marine aquaculture and can be used for performing experiments in marine biology, physiology and biochemistry, and for biological tests in marine toxicology, as well as in useful larval sea fish growing. According to the method, calanus females caught from the natural environment are kept in a disinfectant solution at temperate 15°C for 1.5 hours with microalgae *Exuviaella cordata* added; that is followed by performing a preparation procedure for synchronising mass production of eggs used to produce synchronous hatching of nauplii and synchronous birth

cohorts of calanus. The advantages of the method consist in the fact that optimal thermal, trophic and density environment are presented for the first time to synchronise and standardise the processes of egg production by calanus females, calanus egg development and hatching, young calanus development and growth until reaching the last life stages. The egg disinfection enables eliminating the pathogenic microorganisms affecting both calanus's ability to survive, and larval fish's ability of survive when using them as living feed.

EFFECT: method enables performing the pre-assessment of the quantity and quality of the produced material.

RU 2 541 458 C1

RU 2 541 458 C1

Предполагаемое изобретение относится к области морской аквакультуры и может быть использовано для проведения экспериментальных работ по морской биологии, физиологии и биохимии и для биологического тестирования в области морской токсикологии, а также в качестве живых кормов при выращивании личинок ценных морских рыб.

Каланоидные копеподы являются важным компонентом морской пищевой цепи и наиболее полноценным живым кормом как для личиночных, так и взрослых стадий морских рыб. Поэтому разработка способа их культивирования с целью получения массового количества однородных организмов, выращенных в заданных условиях среды, характеризующихся однородным возрастным и биохимическим составом, важна как для проведения достоверных экспериментальных работ в области морской биологии, экологии, физиологии, биохимии, биологического тестирования, так и для разработки методов выращивания полноценной здоровой молодежи ценных пород морских рыб (например, камбалы калкана).

До настоящего времени не разработан ни один способ массового культивирования черноморских каланоидных копепод *Calanus euxinus* из яйца до половозрелого организма.

Известен способ выращивания близкородственного атлантического вида каланоидных копепод *Calanus helgolandicus* {см. Paffenhofen G.-A. Cultivation of *Calanus helgolandicus* under controlled conditions // Helg. wiss Meeresunters. - 1970. - 20. - P. 346-359}. Способ предусматривает отлов из морских акваторий диких самок калянуса и одноразовое получение от них яиц при температуре 15°C. Для кормления науплиев калянуса в 1-2 л цилиндры вносят морские микроводоросли - диатомовые *Lauderia borealis*, *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros curvicaus*, и динофлагелляты *Gymnodinium splendens*. Для минимального времени достижения половозрелости от яйца рекомендуется поддерживать концентрации микроводорослей около 100 мкг С/л. Плотность калянусов от выклева из яйца до копеподита С1 снижают от 0,33 до 0,023 экз/мл.

Известный способ имеет ряд существенных недостатков.

Основными недостатком является невозможность предварительной оценки количества и качества получаемого материала - науплиев калянусов из яиц, полученных от самок калянусов, развивавшихся в естественных условиях. Во-первых, количество яиц, производимых самками калянуса из естественных условий, непредсказуемо, так как зависит от количества и качества их питания во внешней среде. Во-вторых, при использовании известного способа непредсказуем процент жизнеспособных яиц, и, следовательно, процент жизнеспособных науплиев, так как питание самок в естественных условиях неконтролируемо, а из литературных и собственных экспериментальных данных известно, что даже при высокой продуктивности яиц, процент жизнеспособных науплиев калянуса зависит от качественного состава пищи самок. В-третьих, при получении яиц от самок не производится дезинфекция яиц и, таким образом, из внешней среды переносятся патогенные микроорганизмы, влияющие как на выживаемость самих калянусов, так и, при использовании их в качестве живых кормов, на выживаемость личинок рыб.

В основу «Способа культивирования каланоидных копепод *Calanus euxinus* (черноморского калянуса)» поставлена задача путем разработки новой технологии культивирования, обеспечить получение синхронной массовой популяции калянуса, состоящей из особей однородного возрастного, размерного и биохимического состава за определенный срок.

Поставленная задача достигается тем, что отловленных самок выдерживают в

дезинфекционном растворе при температуре 15°C в течение 1,5 часов с добавлением микроводорослей *Euxydiaella cordata*, после чего осуществляют процедуру подготовки для синхронизации массового получения яиц, получают синхронную массу яиц, из которых производят синхронный выклев науплиев и получают синхронные возрастные когорты калянуса.

Синхронная культура калянусов необходима для получения массового количества калянусов (науплиальных или копеподитных стадий) заданного возраста (размера, биохимического состава). В течение жизненного цикла калянус проходит 6 науплиальных (личиночных, обозначаемых N1-N6), 5 - копеподитных стадий (C1-C5) и одну, последнюю, 12 жизненную стадию - взрослый калянус (самка или самец, обозначаемую C6♀ или C6♂). Переход от одной стадии к другой осуществляется в результате морфологических изменений, нарастания массы и размеров тела и смены покровов (линьки). После перехода (линьки) в стадию C6, калянус достигает терминальных размеров тела, и линек больше не происходит. В дальнейшем может происходить только прирост биомассы калянуса, например, за счет отложения запасных веществ и формирования генеративной продукции (яиц). Сроки достижения (прохождения очередной линьки) каждой последующей стадии калянуса обусловлены эндогенными (запрограммированными генетически) механизмами процессов и зависят от комплекса модифицирующих их температурных и трофических условий содержания организмов.

Способ реализуется следующим образом.

- 1) Получение самок калянуса
- 2) Процедура подготовки самок калянуса для синхронизации массового получения яиц.
- 3) Процедура получения синхронной массы яиц калянуса.
- 4) Процедура синхронного выклева науплиев из яиц.
- 5) Получение синхронных возрастных когорт калянуса

Пример реализации способа получения самок калянуса. В ноябре 2003 г. производили траления зоопланктонной сетью на глубинах от 40 до 0 м. Полученные зоопланктонные пробы доставляли в лабораторные помещения. Половозрелых самок калянуса отделяли от основной массы планктона и помещали в дезинфекционный раствор, приготовленный на основе морской воды стандартной черноморской солености 17,5-18,5 ‰, стерилизованной путем механической фильтрации (через ряд последовательных картриджных фильтров 10, 5, 1 мкм) и обработки ультрафиолетом. Самок калянуса при температуре 15°C выдерживали в дезинфекционном растворе с добавлением микроводорослей *Euxydiaella cordata* (syn. *Prorocentrum minimum*) в течение 1,5 часов.

Подготовка самок калянуса для синхронизации получения яиц. Самок калянусов промывали стерильной морской водой и помещали в контейнеры со стерильной морской водой при минимальном объеме 10 мл на самку при температуре 7±1°C. В таких условиях самок содержали от 1 до 14 суток, при условии ежедневной подмены 0,1 объема воды. В процессе содержания при низкой температуре возрастной состав у самок калянусов, готовых к вымету гамет, синхронизировался.

Получение яиц калянуса. Для перевода самок в режим размножения разбавляли среду, в которой находились самки, стерильной морской водой до 100 мл на особь, и переносили сосуды на рассеянный свет (оптимум 500 люкс) при температуре 15±1°C с добавлением оптимального для производства яиц и жизнеспособности науплиев корма - микроводоросли *Euxydiaella cordata* в концентрации 5·10⁴ кл/мл.

Через 24 часа получали до 10-30 яиц на самку в сутки, в зависимости от исходного состояния половозрелой самки. Яйца калянусов получали ежесуточно на протяжении

от 14 до 30 суток (в зависимости от качества исходного материала), после чего самок калянусов заменяли новой партией.

Выклев науплиев из яиц. Яйца, которые были отделены с помощью сита с размером ячеей 70 мкм, обрабатывали дезинфицирующим раствором в течение 30 мин и переносили в инкубаторы со стерильной морской водой при плотности 10 экз/мл. При температуре $16 \pm 1^\circ\text{C}$ через сутки из яиц происходил массовый выклев первых науплиальных стадий калянусов. Жизнеспособные науплии составляли до 95% от общей массы собранных яиц. При необходимости, выклев науплиев из собранных яиц задерживали на сутки путем временного перемещения яиц сразу после сбора в темноту при температуре $7 \pm 1^\circ\text{C}$.

Получение синхронных возрастных когорт калянуса. Из общей массы жизнеспособных науплиев отбирали необходимую для проведения экспериментов партию науплиев, которых переводили на подращивание до необходимой стадии развития (размерной группы). Науплиев при плотности 5 экз/мл помещали в стерильную морскую воду соленостью 18‰ при температуре $17 \pm 1^\circ\text{C}$ и освещенности 1000 - 2000 люкс. Для стабилизации среды добавляли примнезиофитовые микроводоросли *Isochrysis galbana* (клон T-Iso) (экспоненциальная фаза роста), в концентрации 10^3 кл/мл. Через сутки науплии проходили первую линьку и переходили на вторую науплиальную стадию N2 (первую питающуюся стадию). В качестве корма науплиям добавляли 10^5 кл/мл ($0.9 \text{ мкг С мл}^{-1}$) T-Iso. Такую концентрацию корма поддерживали до четвертых суток после выклева.

В конце четвертых суток после выклева, когда 50% науплиев переходили на четвертую науплиальную стадию N4, состав корма модифицировали: к $4,5 \cdot 10^4$ кл/мл T-Iso добавляли $0,5 \cdot 10^4$ кл/мл динофлагеллят *Euxiella cordata* (Eux), т.е. в соотношении концентрации клеток 4:1. В совокупности эта концентрация клеток смеси кормовых микроводорослей составляла $5 \cdot 10^4$ кл/мл.

Ежедневно на протяжении науплиального периода объем стерильной воды увеличивали вдвое для снижения плотности науплиев и корректировали концентрацию микроводорослей. На протяжении 7-8 сут после выклева из яиц происходило 5 последовательных науплиальных линек, приводящих к получению последней шестой науплиальной стадии N6.

Со второй недели культивирования (8-10 сут после выклева) происходил массовый переход от науплиальных к копеподитным стадиям калянуса. Морскую воду, в которой находились калянусы, меняли на 75% и доводили до объема, который соответствовал 20 мл на 1 копеподита C1. К началу копеподитного периода когорты калянуса плотность организмов в культуре составляла не более 0.05 экз/мл. Объем воды ежедневно подменяли на 0.2 объема и производили постепенное разбавление плотности калянусов, таким образом, чтобы к 15 сут на 1 калянуса приходилось 80 мл среды. Концентрацию микроводорослей в культуре калянусов с 9 до 15 сут поддерживали на уровне $3 \cdot 10^4$ кл/мл смеси микроводорослей T-Iso и Eux в соотношении концентрации клеток 2:1.

Начиная с 15 сут (копеподитной стадии C3) по 18 сут после выклева из яйца, калянусов кормили смесью динофлагеллят: $5 \cdot 10^3$ кл/мл Eux, и 10^3 кл/мл *Prorocentrum micans* (Pmc). Совокупная концентрация клеток этих видов микроводорослей в культуре калянуса составляла $6 \cdot 10^3$ кл/мл смеси при соотношении видов 5:1.

С 18 сут после выклева из яйца (при переходе к четвертой копеподитной стадии C4)

калянусов продолжали кормить смесью Eх₁ и Pm_c, но соотношение концентраций клеток смещали в сторону более крупных клеток (3:1), которая составила в совокупности 410³ кл/мл.

С 21 сут после достижения пятой копеподитной стадии (С5), калянуса кормили исключительно Pт_e, концентрацию клеток которого поддерживали на уровне 210³ кл/мл до достижения стадии взрослого калянуса (С6), т.е. на 28-31 сутки выращивания калянуса от яйца.

В результате получили следующие временные когорты калянуса (табл.1).

Таблица 1.

| Стадия | Размер (μм) | Возраст (сут) | Плотность (экз/мл) | Корм (кл/мл) |
|--------------|-------------|---------------|--------------------|-------------------|
| яйца | 190±5 | 0 | 10 | 0 |
| науплий N1 | 212.5±12.5 | 1 | 5 | 10 ³ |
| науплий N2 | 300±25 | 2 | 2.5 | 10 ³ |
| науплий N3 | 390±35 | 3 | 1 | 10 ³ |
| науплий N4 | 490±45 | 4-5 | 0.5 | 5·10 ⁴ |
| науплий N5 | 560±65 | 6-7 | 0.25 | 5·10 ⁴ |
| науплий N6 | 680±70 | 7-9 | 0.1 | 5·10 ⁴ |
| копеподит С1 | 925±25 | 10-12 | 0.05 | 3·10 ⁴ |
| копеподит С2 | 1145±105 | 12-15 | 0.025 | 3·10 ⁴ |
| копеподит С3 | 1650±150 | 15-18 | 0.0125 | 6·10 ³ |
| копеподит С4 | 2050±175 | 18-21 | 0.006 | 4·10 ³ |
| копеподит С5 | 2500±200 | 21-27 | 0.003 | 2·10 ³ |
| копеподит С6 | 3100±300 | 28 - 31 | 0.003 | 2·10 ³ |

Размерный состав культивируемых когорт черноморского калянуса, изменялся от 212.5±12.5 до 3100±300 цм соответственно стадиям развития (N1 до С6) в усредненные сроки получения их (от 1 до 28 - 31 сут) при приведенных стандартных трофических условиях и плотности культивирования, при стандартной температуре культивирования (17±1°С). Размер (в микронах) соответствует для яйца - его диаметру; для возрастных стадий калянуса - его общей длине.

Минимальное время генерации от выклева из яйца до достижения стадии С6 при оптимальном питании составило 30 сут (при среднесуточной температуре 17±1°С), максимальное - 60 сут (при среднесуточной температуре 9±1°С). Максимальная выживаемость от стадии яйца до взрослого калянуса при применении предлагаемого способа культивирования - 50%.

Заявляемый способ культивирования каланоидных копепод *Calanus euxinus* (черноморского калянуса) обладает рядом преимуществ:

впервые предложены оптимальные температурные, трофические и плотностные условия для синхронизации и стандартизации процессов продуцирования яиц самками калянусов, развития и выклева яиц калянусов, развития и роста молоди калянусов до достижения последней жизненной стадии;

проведение дезинфекции яиц позволяет освободиться от патогенных микроорганизмов, влияющих как на выживаемость самих калянусов, так и при использовании их в качестве живых кормов на выживаемость личинок рыб; предлагаемый способ позволяет осуществлять предварительную оценку количества и

качества получаемого материала.

Формула изобретения

1. Способ культивирования каланоидных копепод *Calanus euxinus* (черноморского калянуса), включающий отлов самок, получение от них яиц и науплиев в искусственных условиях, кормление морскими микроводорослями, отличающийся тем, что отловленных самок выдерживают в дезинфекционном растворе при температуре 15°C в течение 1,5 часов с добавлением микроводорослей *Exuviaella cordata*, после чего осуществляют процедуру подготовки для синхронизации массового получения яиц, получают синхронную массу яиц, из которых производят синхронный выклев науплиев и получают синхронные возрастные когорты калянуса.

2. Способ культивирования каланоидных копепод *Calanus euxinus* (черноморского калянуса) по п. 1, отличающийся тем, что процедуру подготовки для синхронизации массового получения яиц осуществляют путем помещения самок в контейнеры со стерильной морской водой с температурой $7\pm 1^\circ\text{C}$ и выдерживания от 1 до 14 суток при условии ежедневной подмены 0,1 объема воды.

3. Способ культивирования каланоидных копепод *Calanus euxinus* (черноморского калянуса) по п. 1, отличающийся тем, что для получения синхронной массы яиц емкости с самками помещают на рассеянный свет при температуре $15\pm 1^\circ\text{C}$ и добавляют микроводоросли *Exuviaella cordata* в концентрации $5\cdot 10^4$ кл/мл.

4. Способ культивирования каланоидных копепод *Calanus euxinus* (черноморского калянуса) по п. 1, отличающийся тем, что для синхронного выклева науплиев яйца обрабатывают дезинфицирующим раствором и помещают в инкубаторы со стерильной морской водой с температурой $16\pm 1^\circ\text{C}$ при плотности 10 экз/мл.

5. Способ культивирования каланоидных копепод *Calanus euxinus* (черноморского калянуса) по п. 1, отличающийся тем, что синхронные возрастные когорты калянуса получают путем подращивания до необходимой стадии развития в течение 1-30 суток.

6. Способ культивирования каланоидных копепод *Calanus euxinus* (черноморского калянуса) по пп. 1, 5, отличающийся тем, что науплиев при плотности 5 экз/мл помещают в стерильную морскую воду соленостью 18‰ при температуре $17\pm 1^\circ\text{C}$ и освещенности 1000 - 2000 люкс и на 2-е сутки добавляют примнезиофитовые микроводоросли *Isochrysis galbana* (клон T-Iso) в концентрации 10^3 кл/мл, доводя до 10^5 кл/мл на 4-е сутки.

7. Способ культивирования каланоидных копепод *Calanus euxinus* (черноморского калянуса) по пп. 1, 5, отличающийся тем, что при подращивании до четвертой науплиальной стадии N4 корм состоит из T-Iso и динофлагеллят *Exuviaella cordata* (Exu) в соотношении 4:1.

8. Способ культивирования каланоидных копепод *Calanus euxinus* (черноморского калянуса) по пп. 1, 5, отличающийся тем, что на 8-10-е сутки производят замену морской воды на 75% и доводят до объема 20 мл на 1 копепо дита C1 при плотности не более 0.05 экз/мл, а к 15-м суткам разбавление плотности доводят до 80 мл среды на 1 экз., при этом корм состоит из смеси микроводорослей T-Iso и Exu в соотношении 2:1.

9. Способ культивирования каланоидных копепод *Calanus euxinus* (черноморского калянуса) по пп. 1, 5, отличающийся тем, что с 15 по 18 сутки (копеподитная стадия C3) калянусов кормят смесью динофлагеллят Exu, и *Prorocentrum micans* (Pmc) при соотношении 5:1.

10. Способ культивирования каланоидных копепод *Calanus euxinus* (черноморского калянуса) по пп. 1, 5, отличающийся тем, что с 18 суток (при переходе к четвертой копеподитной стадии C4) калянусов кормят смесью *Exuviaella cordata* и *Prorocentrum*

micans при соотношении 3:1.

11. Способ культивирования каланоидных копепод *Calanus euxinus* (черноморского калянуса) по пп. 1, 5, отличающийся тем, что с 21 по 30 сутки (копеподитная стадия C5-C6) калянуса кормят *Prorocentrum micans* при концентрации клеток $2 \cdot 10^3$ кл/мл.

5

10

15

20

25

30

35

40

45