

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
G01N 33/18 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2017129168, 15.08.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
15.08.2017Дата регистрации:  
25.04.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 15.08.2017

(45) Опубликовано: 25.04.2018 Бюл. № 12

Адрес для переписки:

299011, г.Севастополь, пр. Нахимова, 2,  
Директору Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки "Институт  
морских биологических исследований имени  
А.О. Ковалевского РАН" С.Б. Гулину

(72) Автор(ы):

Пиркова Анна Васильевна (RU),  
Ладыгина Людмила Владимировна (RU),  
Бобко Николай Иванович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки "Институт морских  
биологических исследований имени А.О.  
Ковалевского РАН" (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: Ходаков И.В. Методы  
использования ранних эмбрионов  
черноморской мидии для биотестирования  
при мониторинге прибрежных зон северо-  
западного шлейфа//Тезисы всероссийской  
конференции "Экосистемы морей России в  
условиях антропогенного пресса (включая  
промысел)". Астрахань. 20-22.12.1994, стр.  
352-353. RU 2505489 C1, 27.01.2014, стр. 1, 3, 4, 8.  
Т. Р. (см. прод.)(54) СПОСОБ ОЦЕНКИ ПРИГОДНОСТИ МОРСКОЙ ВОДЫ ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ  
ПРОМЫСЛОВЫХ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биологии, аквакультуре и представляет собой способ оценки пригодности морской воды для выращивания промысловых двустворчатых моллюсков, заключающийся в том, что в качестве тест-объекта оценки качества воды используют оплодотворенные яйцеклетки двустворчатых моллюсков *Mytilus galloprovincialis*, развитие которых осуществляют в тестируемой воде и в контроле, после чего сравнивают воздействие тестируемой среды и контроля на развитие эмбрионов, отличающийся тем, что через 12 мин после оплодотворения яйцеклетки промывают профильтрованной морской водой, разделяют на равные части и выдерживают 2 часа 36 мин в

тестируемой среде и в контроле при оптимальной плотности посадки оплодотворенных яйцеклеток 50 тыс. кл./л, температуре морской воды 14,7°C, а критериями воздействия считают уровень эмбрионального развития личинок, наличие или отсутствие хромосомных аномалий в эмбриональных клетках мидии, а также значение содержания минеральных и органических фосфатов в тестируемой морской воде, не превышающее 12 мкг·л<sup>-1</sup>. Изобретение обеспечивает достоверную оценку биокачества морской воды для выращивания личинок промысловых моллюсков в питомнике и при выборе участков акватории моря для марикультуры. 2 з.п. ф-лы. 1 пр., 2 табл. 7 ил.

C1  
2 6 5 2 2 7 1  
R UR U  
2 6 5 2 2 7 1  
C 1

(56) (продолжение):

Yoshino et al. Molluscan cells in culture: primary cell cultures and cell lines. Canadian Journal of Zoology 01.06.2013, 1(6) стр. 2012-0258.

R U 2 6 5 2 2 7 1 C 1

R U 2 6 5 2 2 7 1 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC  
*G01N 33/18 (2006.01)*

(21)(22) Application: 2017129168, 15.08.2017

(24) Effective date for property rights:  
15.08.2017

Registration date:  
25.04.2018

Priority:

(22) Date of filing: 15.08.2017

(45) Date of publication: 25.04.2018 Bull. № 12

Mail address:  
299011, g.Sevastopol, pr. Nakhimova, 2, Direktor  
Federalnogo gosudarstvennogo byudzhetnogo  
uchrezhdeniya nauki "Institut morskikh  
biologicheskikh issledovanij imeni A.O.  
Kovalevskogo RAN" S.B. Gulinu

(72) Inventor(s):

Pirkova Anna Vasilevna (RU),  
Ladygina Lyudmila Vladimirovna (RU),  
Bobko Nikolaj Ivanovich (RU)

(73) Proprietor(s):

Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe  
uchrezhdenie nauki "Institut morskikh  
biologicheskikh issledovanij imeni A.O.  
Kovalevskogo RAN" (RU)

RU 2652271 C1

(54) METHOD FOR ASSESSING SUITABILITY OF SEA WATER FOR GROWING COMMERCIAL BIVALVE MOLLUSKS

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biology, aquaculture, and is method for assessing suitability of sea water for growing commercial bivalve molluscs, consisting in the use of fertilized egg cells of bivalve *Mytilus galloprovincialis* as a test object for water quality assessment, the development of which is carried out in the test water and in control, and then compare the effect of the test medium and the control on the development of embryos, characterized in that 12 minutes after fertilization the eggs were washed was filtered seawater were separated into equal parts and kept 2 hours and 36 minutes in the test medium and in

the control at optimal density planting fertilized eggs 50 thousand Cl./l seawater temperature 14.7°C, and impact criteria consider level of embryonic development of larvae, the presence or absence of chromosomal abnormalities in embryonic mussels, and the value of mineral and organic phosphate content in the test sea water not exceeding 12 mcg·l<sup>-1</sup>.

EFFECT: invention provides reliable estimate of biochemical quality of sea water for the cultivation of larvae of commercial shellfish in the nursery and when selecting areas of the sea for marinas.

3 cl, 1 ex, 2 tbl, 7 dwg

RU 2652271 C1

Изобретение относится к аквакультуре, а точнее к конхиокультуре и предназначено для определения биокачества морской воды, подходящей для выращивания личинок промысловых двустворчатых моллюсков, как в питомнике, так и при выборе акватории для морихозяйств.

- 5 Аварийные сбросы в море хозяйствственно-бытовых сточных вод загрязняют прибрежную акваторию. Их многократное повторение в течение многих лет нарушает экологическое равновесие и может привести к необратимым изменениям [1,2]. Загрязняющие вещества или поллютанты (минеральные или органические) могут находиться в растворенном, либо взвешенном состоянии, а иногда в виде эмульсий.
- 10 Поллютанты характеризуются токсичностью, стойкостью к разрушению. Вещество считается токсичным, если, попадая в воду, оно вызывает гибель организмов. Но имеется обширный класс загрязняющих отравляющих веществ, которые не являются остротоксичными. К ним относятся соли тяжелых металлов и синтетические органические вещества: например поверхностно-активные вещества (ПАВ). Они могут
- 15 сорбироваться на поверхности микроводорослей, затем концентрироваться в поедающих их моллюсках [9].

В синтетических моющих средствах находятся полифосфаты [3, 5]. Попадая в морскую воду с аварийными сбросами неочищенных бытовых стоков, они образуют продукты гидролиза, которые являются опасными для водных экосистем. Избыток фосфора

- 20 инициирует следующую цепочку: бурный рост растений, отмирание растений, их гниение, обеднение водоемов кислородом, ухудшение жизни организмов. Они опасны для всего живого в воде даже в очень малых концентрациях. Загрязнение вод моющими средствами осложняется еще и тем, что даже их биологическое разрушение не является решением проблемы, так как и продукты разрушения являются токсичными в некоторых случаях.
- 25 Микроорганизмы, процеживая через себя воду, вместе с питательными веществами получают и дозу загрязнителя. Загрязнение распространяется по пищевой цепи, концентрация такого вещества на единицу веса каждого последующего консумента возрастает.

Наиболее близок к направлению исследований Метод использования ранних

- 30 эмбрионов черноморской мидии для биотестирования при мониторинге прибрежных зон северо-западного шельфа [8], где в качестве тест-объекта оценки качества воды используют эмбрионы иглокожих и двустворчатых моллюсков. В способе осемененные яйцеклетки помещают в тестируемую среду. Критерием воздействия тестируемой среды на развитие эмбрионов является достоверное отличие между распределениями
- 35 эмбрионов по стадиям дробления в контроле и тестируемой среде, для чего используют показатель соответствия хи-квадрат. В способе принято, что относительная синхронность ниже 1 свидетельствует об угнетении тестируемой средой процесса дробления у эмбрионов; превышающая 1 - о стимулирующем воздействии. Расчет показателей относительной синхронности производят с использованием процентного
- 40 содержания эмбрионов на стадиях зиготы, двух и восьми бластомеров.

Применение известного способа затруднено из-за ряда недостатков, снижающих достоверность результатов:

1. отсутствует информация о гидрохимических характеристиках морской воды, используемой в качестве контроля;
- 45 2. не описана методика проведения оплодотворения без полиспермии;
3. не приведены данные о плотности посадки оплодотворенных яйцеклеток (тыс. кл./л) в контроле и опытах;
4. не указаны причины отставания развития эмбрионов в опытах по сравнению с

контролем;

5. подсчет достоверности различий между контролем и опытом, проведенный методом хи-квадрат без каких-либо модификаций и без другого исправляющего контекста, обычно дает посредственные результаты. Такие критерии редко применяются на практике, поскольку величина дисперсии распределения обычно неизвестна.

Задача изобретения состоит в обеспечении исследователей качественным и достоверным методом оценки пригодности воды для выращивания личинок промысловых двустворчатых моллюсков.

Техническим результатом изобретения является достоверная оценка биокачества

10 морской воды для выращивания личинок промысловых моллюсков в питомнике и при выборе участков акватории моря для марихозяйств. Техническим результатом является также точность в определении качества морской воды, т.к. в способе реализуется комплексный подход, в исследования включены гидрохимические и биологические показатели. Техническим результатом является возможность использования способа

15 в качестве экспресс-метода определения пригодности морской воды.

Для достижения поставленной задачи, а также для устранения недостатков в прототипе в заявляемом способе, включающем использование в качестве тест-объекта оплодотворенных яйцеклеток двустворчатых моллюсков *Mytilus galloprovincialis*, развитие которых осуществляют в тестируемой воде и в контроле, после чего сравнивают

20 воздействие тестируемой среды и контроля на развитие эмбрионов, предусмотрены ряд изменений. Яйцеклетки промывают профильтрованной морской водой через 12 мин после оплодотворения, затем разделяют на равные части и выдерживают 2 часа 36 мин в тестируемой среде и в контроле при оптимальной плотности посадки оплодотворенных яйцеклеток 50 тыс. кл./л, температуре морской воды 14,7°C. Под

25 критериями воздействия понимают уровень эмбрионального развития личинок, наличие или отсутствие хромосомных аномалий в эмбриональных клетках мидии, а также значение содержания минеральных и органических фосфатов в тестируемой морской воде, не превышающее 12 мкг·л<sup>-1</sup>. Кроме того, уровень эмбрионального развития оценивают путем сравнения процентного соотношения эмбрионов мидии с двумя и 30 четырьмя бластомерами, развитие которых происходило в контроле и в тестируемой воде. Кроме того, под хромосомными аномалиями в эмбриональных клетках мидии понимают полиплоидию (нерасхождение хромосом); лизис гистонов хромосом в метафазе II мейоза и метафазе митоза, фрагментацию хромосом в метафазе митоза 35 выпадение хромосом в анафазе митоза и неравномерное деление хромосом, образование «мостов», многополярность веретена деления хромосом; блокировку цитокинеза.

Заявляемый способ поясняется иллюстрациями.

Фиг. 1 - Триплоидные эмбрионы мидии: а - метафаза митоза; б - анафаза митоза.

Фиг. 2 - Лизис гистонов хромосом в метафазе II мейоза (а) и в метафазе митоза (б), фрагментация хромосом в метафазе митоза (в).

40 Фиг. 3 - Выпадение хромосом в анафазе митоза и неравномерное деление хромосом (а); мости и не расхождение хромосом (б); многополярность веретена деления хромосом (в).

Фиг. 4 - Блокировка цитокинеза на анафазе митоза (а); на профазе митоза (б).

45 Фиг. 5 - Аномальное эмбриональное деление: хромосомы остались в одном из бластомеров.

Фиг. 6 - Отделение от бластомеров части хромосом с цитоплазмой.

Фиг. 7 - Тетраплоидные эмбриональные клетка (а), блокировка деления центромер (б); множественные мости и не расхождение хромосом в анафазе митоза (в);

фрагментация хромосом (г).

Степень воздействия загрязняющих веществ на гидробионтов зависит от их типа, концентрации, физиологического состояния, стадии онтогенеза и многих внешних факторов. Наиболее чувствительные - стадии эмбрионального и личиночного развития.

<sup>5</sup> Авторами проводились исследования уровня эмбрионального развития и наличие хромосомных аномалий в эмбриональных клетках мидии *Mytilus galloprovincialis*, возникающих в результате воздействия на оплодотворенные яйцеклетки мидии раствором порошка «Ушастый нянь - автомат» концентрации 0,001% и 0,005% в течение 5 и 15 мин.

<sup>10</sup> Работу проводили в питомнике ИМБИ РАН в марте-апреле 2017 г. Мидий отбирали на мидийно-устричной ферме (внешний рейд, бухта Севастопольская). Нерест половозрелых особей ( $L=79$  мм) вызывали методом температурной стимуляции. Для проведения группового скрещивания были отобраны 5<sub>♀♀</sub> и 3<sub>♂♂</sub> мидий. Морская <sup>15</sup> вода подавалась со скважины и была профильтрована через установку с набором фильтров диаметром ячеи: 20, 10, 5 и 1 мкм. Для исследования влияния ПАВ на эмбриональное развитие мидий был выбран популярный порошок - «Ушастый нянь - автомат», применяемый для стирки детской одежды. В состав стирального порошка «Ушастый нянь» входят: сульфаты - 15-30%; фосфаты - 15-30%; кислородсодержащие <sup>20</sup> отбеливающие вещества - 5-15%; анионные ПАВ - 5-15%; карбонаты - 5-15%; силикаты - 5-15%; неионогенные ПАВ (<5%); пеногаситель(<5%); энзимы, оптические отбеливатели, отдушки [<https://roscontrol.com/product/ushastiy-nyan/>].

<sup>25</sup> Оплодотворенные яйцеклетки разделили на 4 части. Одну часть перенесли в профильтрованную морскую воду (контроль). Две другие - в раствор порошка «Ушастый нянь» на морской воде концентрации 0,001% на 5 и 15 мин соответственно (опыт 1 и опыт 2), а четвертую - в раствор порошка «Ушастый нянь» концентрации 0,005% на 5 мин (опыт 3).

<sup>30</sup> Затем оплодотворенные яйцеклетки, промытые в профильтрованной морской воде, перенесли в профильтрованную морскую воду температуры 14,7°C для дальнейшего развития. Через 2 часа 36 мин от момента оплодотворения, эмбрионы из контроля и трех опытов зафиксировали в 4% формалине и в этанол-уксусном фиксаторе (3:1) с двумя сменами фиксатора: через 1 час и одни сутки (для хромосомных препаратов).

<sup>35</sup> Ранее [7] авторами было показано, что в воде, отобранный на расстоянии 100 м от городского коллектора бухты Севастопольской, содержание фосфатов составило 126 мкг·л<sup>-1</sup>, что соответственно в 18 раз выше, чем в двухмильной зоне (7 мкг·л<sup>-1</sup>) и 11 раз выше, чем в открытой части бухты (11,45 мкг·л<sup>-1</sup>). Высокое содержание фосфатов указывает на свежее загрязнение [1].

<sup>40</sup> Концентрация фосфатов в морской воде из скважины составила 10 мкг·л<sup>-1</sup> (табл. 1). Суммарное содержание фосфора в растворах стирального порошка на морской воде зависело от концентрации: от 73,4 мкг·л<sup>-1</sup> - в растворе концентрации 0,001%, до 367,0 мкг·л<sup>-1</sup> - в 0,005%-ном растворе. По мере увеличения концентрации раствора увеличивался pH: от 8,03 до 8,08 соответственно при 0,001% и 0,005%, тогда как pH морской воды составил 8,01 (см. табл. 1). Незначительное изменение pH морской воды <sup>45</sup> может быть причиной растворения раковин личинок двустворчатых моллюсков и их

гибели [10].

Таблица 1. Содержание минерального и органического фосфора в контроле и опытах при разной концентрации растворов ПАВ.

№ опытов	Концентрация растворов, %	pH	Содержание фосфора минерального, мкг·л <sup>-1</sup>	Содержание фосфора органического, мкг·л <sup>-1</sup>	Суммарное содержание фосфора, мкг·л <sup>-1</sup>
	Морская вода	8,01	10	0	10
1	0,001	8,03	15,4	58,0	73,4
2	0,001	8,03	15,4	58,0	73,4
3	0,005	8,08	77,0	290,0	367,0

Эмбрионы в контроле и опытах были зафиксированы через 2 часа 36 мин после оплодотворения, когда в контроле началось второе митотическое деление оплодотворенных яйцеклеток и образование эмбрионов с четырьмя бластомерами. Сравнение доли эмбрионов мидии с разным количеством бластомеров в опытах и контроле представлено в табл. 2.

Таблица 2. Уровень развития эмбрионов мидии через 2 часа 36 мин после оплодотворения в контроле и опытах при разной продолжительности воздействия и концентрации растворов порошка «Ушастый нянь – автомат».

№ опытов	Концентрация ПАВ, %	Продолжит. воздействия, мин.	Количество бластомеров			Всего объектов
			1 бластомер	2 бластомера	4 бластомера	
	контроль	–	181 (32,85%)	265 (48,09%)	105 (19,06%)	551
1	0,001	5	320 (56,74%)	175 (31,03%)	69 (12,23%)	564
2	0,001	15	347 (60,74%)	180 (31,63%)	42 (7,38%)	569
3	0,005	5	409 (66,72%)	185 (30,18%)	19 (3,10%)	613

Суммарное содержание минерального и органического фосфора в растворе ПАВ концентрации 0,001% составило 73,4 мкг·л<sup>-1</sup>, что в 1,7 раза ниже, чем вблизи городского коллектора. Таким образом, даже кратковременное воздействие (в течение 5 мин) раствора порошка «Ушастый нянь - автомат» низкой концентрации 0,001% (опыт 1) на оплодотворенные яйцеклетки мидии приводит к торможению деления эмбриональных клеток.

Раствор ПАВ концентрации 0,001%, независимо от продолжительности воздействия (5 или 15 мин), проникая через поры клеточной оболочки яйцеклетки, остается в цитоплазме, вызывая хромосомные аномалии в 25-30% эмбрионов: полиплоидию (нерасхождение хромосом) (Фиг. 1); лизис гистонов хромосом в метафазе II мейоза и метафазе митоза, фрагментацию хромосом в метафазе митоза (Фиг. 2); выпадение хромосом в анафазе митоза и неравномерное деление хромосом, образование «мостов», многополярность веретена деления хромосом (Фиг. 3.); блокировку цитокинеза (Фиг. 4). Все эти аномалии являются следствием разрушения белковых структур: ахроматинового веретена и гистонов - белков, входящих в структуру хромосом и,

возможно, белкового слоя оболочки клетки, вызывая нарушение цитокинеза.

При высокой концентрации - 0,005% и кратковременном воздействии в течение 5 мин на оплодотворенные яйцеклетки мидии, раствор ПАВ нарушает целостность клеточной оболочки. Клетки вытягиваются, эмбрионы приобретают уродливую форму, 5 хромосомы остаются в одном из бластомеров (Фиг. 5). Кроме вышеназванных хромосомных аномалий были отмечены следующие: часть цитоплазмы и хромосом отделяется от бластомеров (Фиг. 6). При норме - 28 хромосом, наблюдались тетраплоидные эмбриональные клетки и фрагментация хромосом; образуются множественные «мосты» и хромосомы не расходятся в анафазе митоза; часто 10 блокируется деление центромер (Фиг. 7).

Оценку достоверности различий в уровне развития эмбрионов мидии в контроле и опытах проводили по критерию Стьюдента для долей. Так, между контролем и опытом №1 воздействие ПАВ концентрации 0,001% в течение 5 мин на оплодотворенные яйцеклетки статистически достоверно с вероятностью 0,999:

$$t_{\phi}=8,055 > t_{st}=3,29.$$

Достоверной разницы в уровне развития эмбрионов мидии в опытах №1 и №2 (концентрация ПАВ - 0,001%, продолжительность воздействия 5 и 15 мин соответственно) не обнаружено:

$$t_{\phi}=1,471 < t_{st}=1,96 \text{ при } P=0,05.$$

20 При сравнении уровня развития эмбрионов мидии в опытах №1 и №3 показано, что воздействие ПАВ концентрации 0,005% в течение 5 мин на оплодотворенные яйцеклетки по сравнению с концентрацией ПАВ 0,001% в течение 5 мин с высокой степенью вероятности (0,999) статистически достоверно:

$$t_{\phi}=5,45 > t_{st}=3,29.$$

Установлено также достоверное различие уровня эмбрионального развития мидии при воздействии на оплодотворенные яйцеклетки раствора порошка концентрации 0,005% в течение 5 мин по сравнению с раствором 0,001% концентрации в течение 15 мин (опыт 3 и 2):

$$t_{\phi}=2,04 > t_{st}=1,96 \text{ при } P=0,05.$$

Следовательно, пригодность морской воды для выращивания личинок промысловых двустворчатых моллюсков возможно определить как по: 1) - концентрации растворенных фосфатов; так и по 2) - уровню эмбрионального развития и 3) - наличию хромосомных аномалий в эмбрионах мидии *Mytilus galloprovincialis*.

35 Способ реализуется следующим образом.

Нерест мидий и оплодотворение проводится в морской воде из скважины проверенного биокачества, в которой эмбриональное развитие мидии проходит без нарушений. Чтобы исключить полиспермию через 12 мин после оплодотворения яйцеклетки промываются в профильтрованной морской воде и разделяются на равные 40 части по объему, для соблюдения одинаковой плотности посадки эмбрионов в контроле и опытах. (Оптимальная плотность посадки оплодотворенных яйцеклеток - 50 тыс. кл./л). Часть оплодотворенных яйцеклеток переносится в морскую воду из скважины (контроль), остальные - в тестируемую воду, отобранную в месте предполагаемого забора морской воды для питомника или в районе планируемого морихозяйства.

45 Температура морской воды в опыте и контроле поддерживается одинаковой - 14,7°C. Через 2 часа 36 мин после оплодотворения оценивается пригодность тестируемой воды: по уровню эмбрионального развития личинок, наличию или отсутствию хромосомных аномалий в эмбриональных клетках мидии, по содержанию фосфатов. Суммарное

содержание минеральных и органических фосфатов в морской воде не должно превышать  $12 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ . Уровень эмбрионального развития оценивается путем сравнения процентного соотношения эмбрионов мидии с двумя и четырьмя бластомерами, развитие которых происходило в контроле и в тестируемой воде. При достоверном превосходстве уровня развития эмбрионов в контроле тестируемая вода непригодна для выращивания личинок промысловых двустворчатых. Под хромосомными аномалиями в эмбриональных клетках мидии понимают полиплоидию (нерасхождение хромосом); лизис гистонов хромосом в метафазе II мейоза и метафазе митоза, фрагментацию хромосом в метафазе митоза выпадение хромосом в анафазе митоза и неравномерное деление хромосом, образование «мостов», многополярность веретена деления хромосом; блокировку цитокинеза. Уровень эмбрионального развития, наличие или отсутствие хромосомных аномалий в эмбриональных клетках мидии, а также суммарное содержание минеральных и органических фосфатов в морской воде, не превышающее  $12 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ , дают возможность оценивать пригодность морской воды для выращивания личинок мидий *Mytilus galloprovincialis*.

#### Пример 1.

Анализ морской воды, предназначенный для выращивания личинок промысловых двустворчатых моллюсков в питомнике.

Нерест мидий *Mytilus galloprovincialis* и оплодотворение яйцеклеток проводили в морской воде из скважины проверенного биоакачества с параметрами  $\text{pH}=8,01$ ; содержанием минерального фосфора -  $10 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$  и отсутствием органических фосфатов, где эмбриональное развитие мидии проходило без нарушений. Через 12 мин после оплодотворения яйцеклетки промывали в профильтрованной морской воде при помощи газ-сита (56 мкм) и разделяли на равные части по объему, для соблюдения одинаковой плотности посадки эмбрионов в контроле и опытах. Соблюдали оптимальную плотность посадки оплодотворенных яйцеклеток - 50 тыс. кл./л. Затем при помощи газ-сита часть оплодотворенных яйцеклеток переносили в морскую воду из скважины (контроль), часть - в тестируемую воду, отобранныю в месте предполагаемого забора морской воды для питомника. Температуру морской воды в опыте и контроле поддерживали одинаковой -  $14,7^\circ\text{C}$ . Через 2 часа 36 мин после оплодотворения изучали уровень эмбрионального развития, наличие или отсутствие хромосомных аномалий в эмбриональных клетках мидии, развитие которых происходило в тестируемой воде. Определяли суммарное содержание минеральных и органических фосфатов в морской воде, которое составило  $12 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ . При сравнении уровня эмбрионального развития мидии в контроле и в тестируемой воде достоверное различие не было отмечено.

Отсутствовали хромосомные аномалии: полипloidия (нерасхождение хромосом); лизис гистонов хромосом в метафазе II мейоза и метафазе митоза, фрагментация хромосом в метафазе митоза, выпадение хромосом в анафазе митоза и неравномерное деление хромосом, образование «мостов», многополярность веретена деления хромосом; блокировка цитокинеза. Следовательно, тестируемая морская вода пригодна для выращивания личинок промысловых двустворчатых моллюсков.

#### Источники информации

1. Алексин О.А. Основы гидрохимии [Текст]: монография. - Л.: Гидромет. Из-во, 1970. - 443 с.
2. Брагинский, Л.П. Биопродукционные аспекты водной токсикологии. [Текст]: / Л.П. Брагинский // Гидробиол. ж-л. - 1988. - 24, №3. - С. 74-83.
3. Бухштаб З.И., Мельник Л.П., Ковалёв В.М. Технология синтетических моющих

средств. [Текст]: / З.И. Бухштаб // М.: «Легкая промышленность», 1988. - 320 с.

4. Методы гидрохимических исследований основных биогенных элементов [Текст]: учеб-метод, пособие / В.В. Сапожников [и др.] - М.: ВНИРО, 1988. - 119 с.

5. Неволин Ф.В. Химия и технология синтетических моющих средств. [Текст]: / Ф.В.

Неволин // М.: «Легкая промышленность», 1971. - 423 с.

6. Лакин, Г.П. Биометрия [Текст]: учебное пособие. - М.: «Высшая школа», 1973. - 342 с.

7. Пиркова А.В., Ладыгина Л.В. Личинки мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. и устрицы *Crassostrea gigas* Th. - индикаторы биокачества морской воды. // Наук зап. Терноп. нац.

<sup>10</sup> пед. ун-ту. Серія біологія. - 2005. - Спец. випуск. Гідроекологія, №4 (27) - С. 182-184.

<sup>15</sup> 8. Ходаков И.В. Метод использования ранних эмбрионов черноморской мидии для биотестирования при мониторинге прибрежных зон северозападного шельфа // Тезисы всероссийской конференции "Экосистемы морей России в условиях антропогенного пресса (включая промысел)", Астрахань, 20-22 сентября, 1994. - Астрахань, 1994. - С. 352-353.

9. Холодов В.И. Выращивание мидий и устриц в Черном море [Текст]: практическое руководство / В.И. Холодов, А.В. Пиркова, Л.В. Ладыгина. - Севастополь: "DigitPrint", 2010. - 422 с.

<sup>20</sup> 10. Томас-Бургнер М., Молло П. Планктон и аспекты морепользования [Текст]: монография / М. Томас-Бургнер, П. Молло. - Севастополь, 2011. - 279 с.

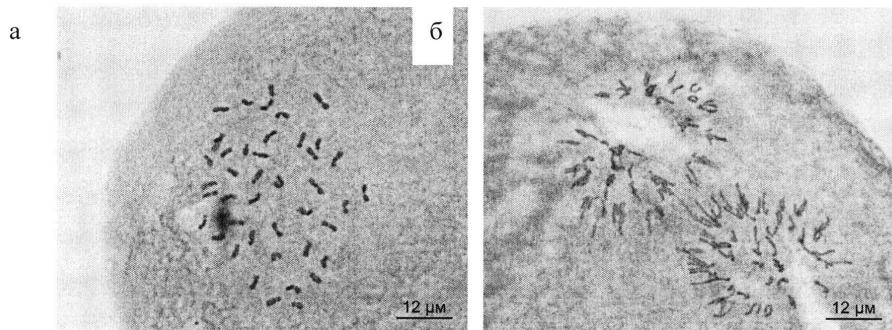
### (57) Формула изобретения

<sup>25</sup> 1. Способ оценки пригодности морской воды для выращивания промысловых двустворчатых моллюсков, заключающийся в том, что в качестве тест-объекта оценки качества воды используют оплодотворенные яйцеклетки двустворчатых моллюсков *Mytilus galloprovincialis*, развитие которых осуществляют в тестируемой воде и в контроле, после чего сравнивают воздействие тестируемой среды и контроля на развитие эмбрионов, отличающийся тем, что через 12 мин после оплодотворения яйцеклетки промывают профильтрованной морской водой, разделяют на равные части и выдерживают 2 часа 36 мин в тестируемой среде и в контроле при оптимальной плотности посадки оплодотворенных яйцеклеток 50 тыс. кл./л, температуре морской воды 14,7°C, а критериями воздействия считают уровень эмбрионального развития личинок, наличие или отсутствие хромосомных аномалий в эмбриональных клетках мидии, а также значение содержания минеральных и органических фосфатов в тестируемой морской воде, не превышающее 12 мкг·л<sup>-1</sup>.

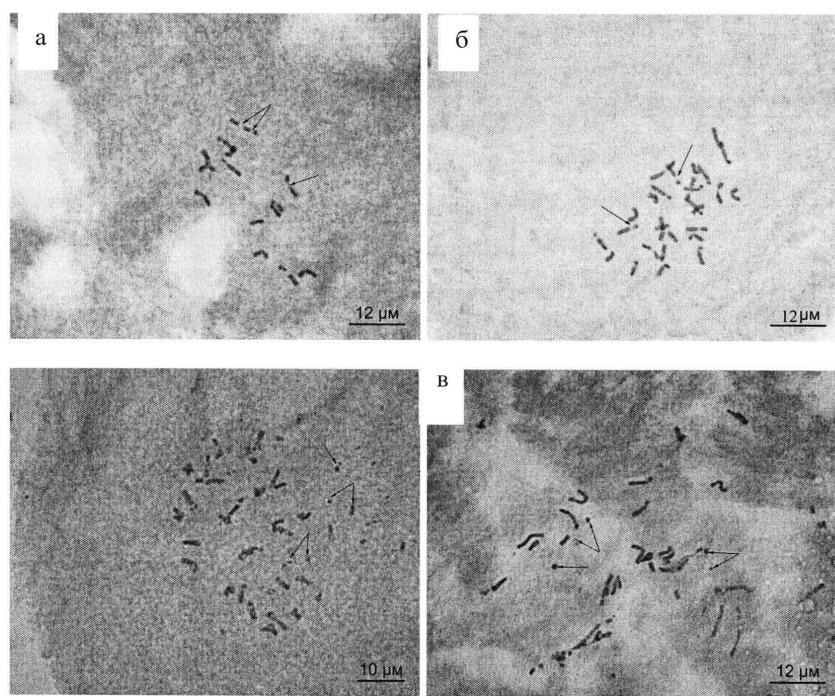
<sup>30</sup> 2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что уровень эмбрионального развития оценивают путем сравнения процентного соотношения эмбрионов мидии с двумя и четырьмя бластомерами, развитие которых происходило в контроле и в тестируемой воде.

<sup>35</sup> 3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что под хромосомными аномалиями в эмбриональных клетках мидии понимают полиглоидию (нерасхождение хромосом); лизис гистонов хромосом в метафазе II мейоза и метафазе митоза, фрагментацию хромосом в метафазе митоза, выпадение хромосом в анафазе митоза и неравномерное деление хромосом, образование «мостов», многополярность веретена деления хромосом; блокировку цитокинеза.

Способ оценки пригодности морской воды для выращивания  
промышленных двустворчатых моллюсков

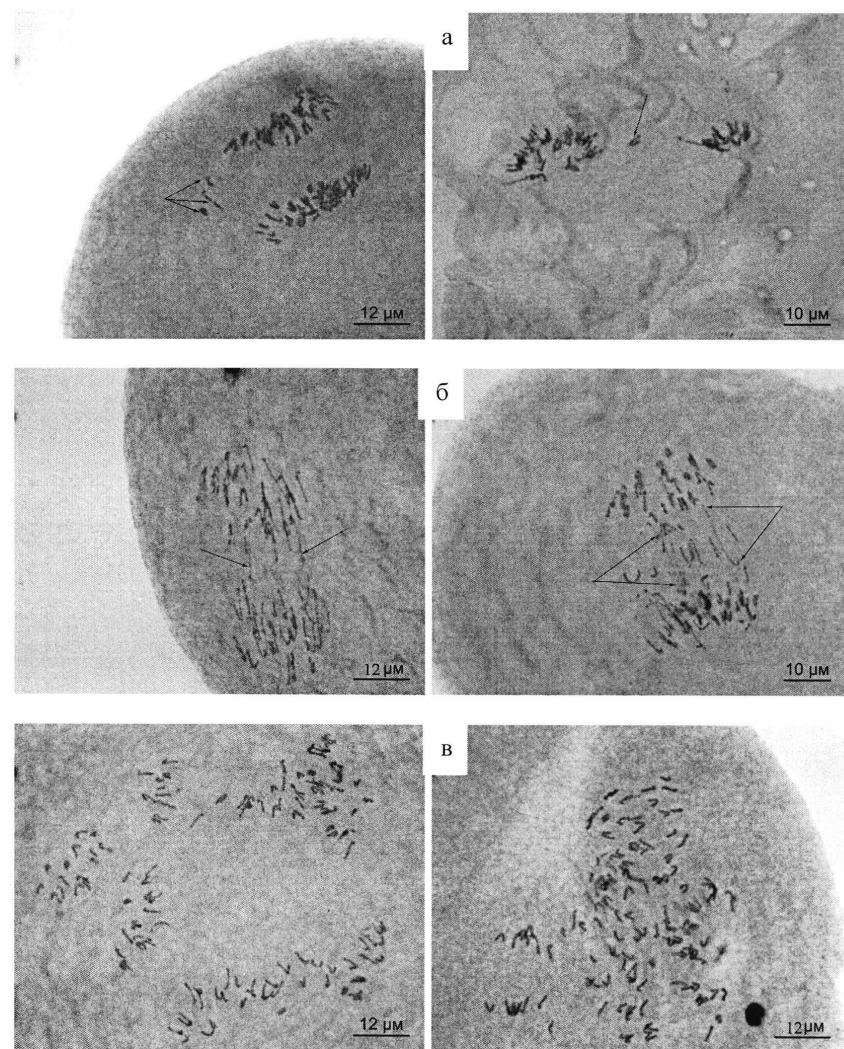


Фиг. 1.



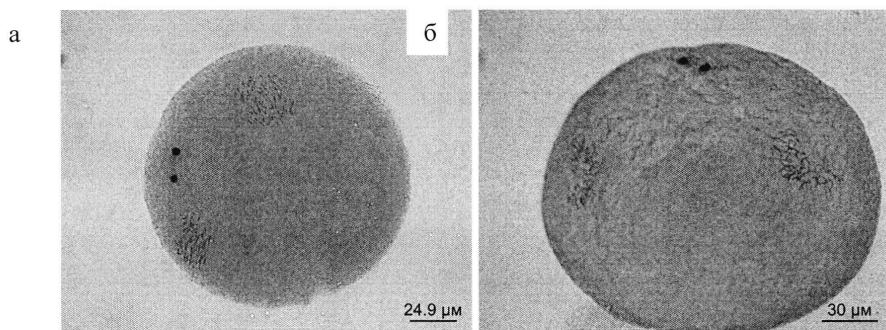
Фиг. 2.

Способ оценки пригодности морской воды для выращивания  
промышленных двустворчатых моллюсков

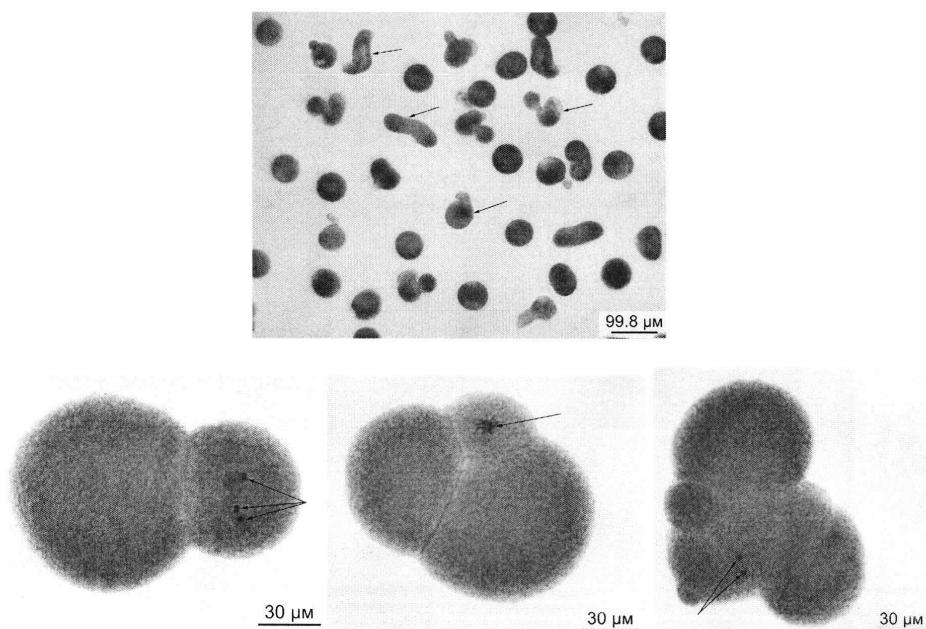


Фиг. 3.

Способ оценки пригодности морской воды для выращивания  
промышленных двустворчатых моллюсков

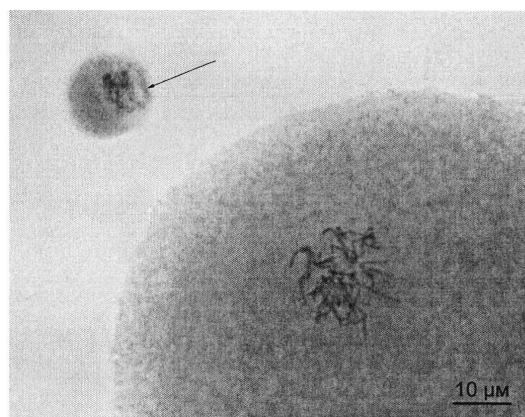


Фиг. 4.

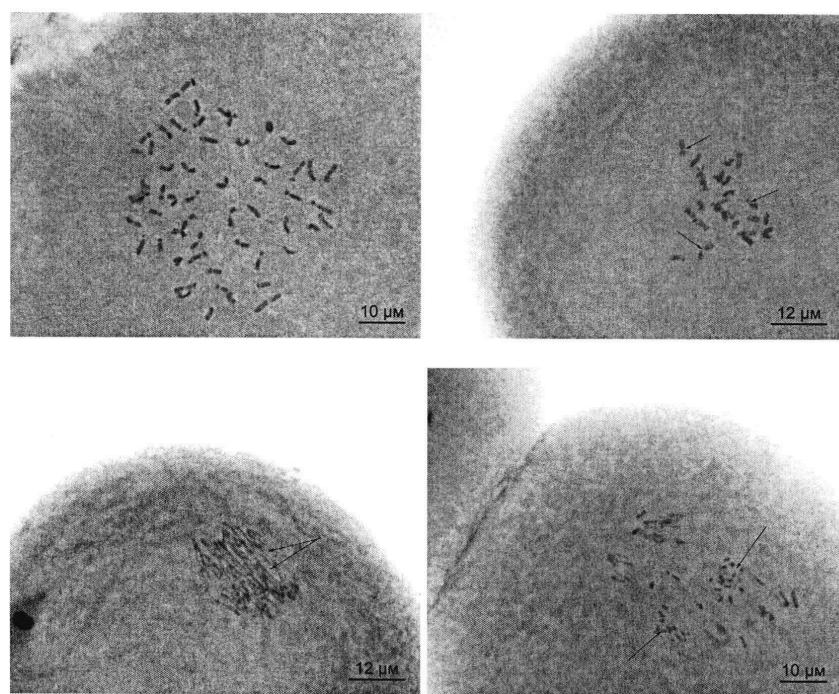


Фиг.5.

Способ оценки пригодности морской воды для выращивания  
промышленных двустворчатых моллюсков



Фиг. 6..



Фиг. 7.