



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A01K 61/00 (2018.08)

(21)(22) Заявка: 2017136662, 17.10.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.10.2017

Дата регистрации:
23.01.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 17.10.2017

(45) Опубликовано: 23.01.2019 Бюл. № 3

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

Караванцева Надежда Владимировна (RU),
Поспелова Наталья Валериевна (RU),
Бобко Николай Иванович (RU),
Нехорошев Михаил Валентинович (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: RU 2548116 C1, 10.04.2015. SU
1161045 A1, 15.06.1985. SU 1083991 A1,
07.04.1984.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛОВЫХ ПРОДУКТОВ МИДИИ MYTILUS GALLOPROVINCIALIS LAM

(57) Реферат:

Способ получения половых продуктов мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. относится к биотехнологии и конхиокультуре. Способ включает отбор мидий, подготовку к нересту и температурную стимуляцию нереста и нерест с получением яйцеклеток и сперматозоидов. После нереста мидий полученные половые продукты пропускают дважды через газ-сито. Для

яйцеклеток используют сито с диаметром ячеей 112 мкм и 56 мкм и центрифугируют четыре раза на скорости 3000 об/мин. Для сперматозоидов применяют газ-сито с диаметром ячеей 56 мкм и центрифугируют 3 раза по 10 мин со скоростью 3500 об/мин и один раз со скоростью 3000 об/мин. Способ обеспечивает получения половых продуктов мидии. 1 пр.

RU
2 6 7 8 1 2 2
C 1

RU
2 6 7 8 1 2 2
C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
A01K 61/00 (2018.08)

(21)(22) Application: **2017136662, 17.10.2017**

(24) Effective date for property rights:
17.10.2017

Registration date:
23.01.2019

Priority:

(22) Date of filing: **17.10.2017**

(45) Date of publication: **23.01.2019** Bull. № 3

Mail address:

**299011, g. Sevastopol, pr. Nakhimova, 2, direktoru
Federalnogo gosudarstvennogo byudzhethnogo
uchrezhdeniya nauki "Institut morskikh
biologicheskikh issledovanij imeni A.O.
Kovalevskogo RAN" d.b.n., prof. S.B. Gulinu**

(72) Inventor(s):

**Karavantseva Nadezhda Vladimirovna (RU),
Pospelova Natalya Valerievna (RU),
Bobko Nikolaj Ivanovich (RU),
Nekhoroshev Mikhail Valentinovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

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

(54) **METHOD FOR PRODUCING REPRODUCTIVE PRODUCTS OF MUSSELS MYTILUS GALLOPROVINCIALIS LAM**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: method for producing reproductive products of mussels *Mytilus galloprovincialis* Lam. relates to biotechnology and conchioculture. Method comprises selection of mussels, preparation for spawning and temperature stimulation of spawning and spawning with the production of eggs and sperm cells. After spawning of mussels, the obtained reproductive products are passed twice through a gas sieve. For eggs,

a sieve with a mesh diameter of 112 mcm and 56 mcm is used for eggs which are centrifuged four times at a speed of 3,000 rpm. For spermatozoids, a gas sieve with a mesh diameter of 56 mcm is used for sperm cells which are centrifuged 3 times for 10 minutes at a speed of 3,500 rpm and once at a speed of 3,000 rpm.

EFFECT: method provides the production of reproductive products of mussels.

1 cl, 1 ex

Изобретение относится к биотехнологии и конхиокультуре и предназначено для повышения эффективности работы морских ферм, а также может быть применено для биохимических и физиологических исследований половых продуктов мидий *M. galloprovincialis* Lam. в период нереста с целью получения биологически активных веществ, используемых в отечественной медицине и фармацевтическом производстве.

Ранее отмечалось [1], что экономическая и экологическая эффективность работы морских ферм зависит от плодовитости выращиваемых моллюсков и качества посадочного материала. Успешность размножения культивируемых мидий обеспечивается не только количеством, но и качеством половых продуктов, которое может быть оценено по морфологическим, биохимическим и физиологическим показателям сперматозоидов и яйцеклеток [2, 3]. Однако решение этой задачи осложняется трудностью сбора необходимого материала и получения чистых суспензий половых клеток, поэтому количественный сбор и качественная очистка половых клеток от примесей представляют большой практический интерес.

Известный способ отбора половых продуктов мидий [8] заключается в сборе яйцеклеток на сите с размером ячеек 56 мкм. Но используя сито или газ невозможно собрать необходимое количество половых продуктов поскольку, если размеры яйцеклеток колеблются в диапазоне 50-80 мкм, то средний размер спермиев составляет 5 мкм, т.е. применение сита для сбора половых клеток самцов нецелесообразно. Недостатком является и то, что невозможно качественно, без примесей, получить суспензию половых клеток моллюсков.

Наиболее близким к заявляемому является способ отбора половых продуктов мидий [1], в котором осуществляют отбор мидий в морской среде, подготовку их к нересту, для чего очищают створки мидий и содержимое желудков. Затем проводят температурную стимуляцию нереста. От момента стимуляции начало нереста самцов происходит через 15 мин., у самок - через 20-30 мин. После нереста выполняют осаждение половых клеток и очищение полученных осадков от морской воды и биоотложений. Для этого используют многократное центрифугирование половых продуктов со скоростью 3000-3500 об./мин., при которой половые клетки хорошо концентрируются. Яйцеклетки, осевшие на дно емкости, отделяют от пробы воды и центрифугируют со скоростью 3000 об./мин. Суспензию сперматозоидов, активность которых сохраняется до 2 суток, поступают следующим образом. Вначале центрифугируют 2-3 раза по 10 мин. до получения прозрачного раствора над осадком. Затем надосадочную жидкость удаляют, осадок растворяют в небольшом количестве фильтрованной морской воды и переносят в другие пробирки, оставляя на дне 0,1-0,2 мл пробы, содержащей посторонние примеси. При центрифугировании на дно пробирки вместе с половыми клетками оседают примеси биоотложений моллюсков. Для получения чистой пробы половых продуктов суспензию клеток 4 раза переносят в чистые пробирки, оставляя на дне 0,05-0,1 мл пробы, содержащей примеси, и вновь центрифугируют при 3000 об./мин. На заключительном этапе воду над осадком максимально удаляют. Недостатком способа является то, что большое количество половых продуктов теряется при осаждении и очистке и затруднительно получить на выходе достаточное количество половых клеток даже в условиях промышленного производства.

Задачей изобретения «Способ получения половых продуктов мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam.» является увеличение количества отбираемых половых клеток, а также получение чистых суспензий сперматозоидов и яйцеклеток черноморских мидий.

Техническим результатом изобретения является количественный отбор чистых половых продуктов мидий: яйцеклеток и сперматозоидов, что повышает эффективность

биохимических и физиологических исследований для мидийных ферм. Кроме того, количественный отбор чистых половых продуктов мидий позволяет использовать их как сырье для получения биологически активных веществ, используемых в отечественной медицине и фармацевтическом производстве.

5 Технический результат изобретения достигается тем, что в способе отбора половых продуктов мидии *Mytilus galloprovincialis* выполняют сбор мидий, подготовку к нересту и температурную стимуляцию нереста, предусматривающую помещение отдельных
10 экземпляров мидий в емкости с фильтрованной водой температурой 18-20°C с поддержанием температуры в течение нереста, а также осаждение половых продуктов и их очищение от биоотложений и морской воды. Для осаждения и очищения половые продукты четырежды центрифугируют со скоростью 3000 об./мин., каждый раз помещая в чистые пробирки. Для яйцеклеток проводят центрифугирование со скоростью 3000 об./мин., а для сперматозоидов центрифугирование проводят 3 раза по 10 мин со
15 скоростью 3500 об./мин. и один раз со скоростью 3000 об./мин. Дополнительно водится новая операция количественного отбора половых продуктов после нереста мидий, для чего яйцеклетки пропускают дважды через газ-сито с диаметром ячеек 112 мкм и 56 мкм соответственно, а сперматозоиды пропускают дважды через газ-сито с диаметром ячеек 56 мкм.

Общими операциями с прототипом являются подготовка мидий к нересту,
20 температурная стимуляция и осаждение половых продуктов путем многократного центрифугирования со скоростью 3000-3500 об./мин, а также очищение от примесей и биоотложений 4-кратным центрифугированием.

Новым по сравнению с прототипом является дополнительная операция количественного отбора половых продуктов, которую проводят перед осаждением и
25 очищением яйцеклеток и сперматозоидов, позволяющая сконцентрировать яйцеклетки на сите, отчистить материал от фекалий и получить максимальное количество половых клеток при массовом нересте черноморских мидий. Новым является повышение качества очистки, т.к. очищение сперматозоидов проводят в два этапа, когда пробу трижды центрифугируют со скоростью 3500 об./мин. по 10 мин, а затем со скоростью 3000 об./
30 мин.

Пример реализации способа.

Подготовка к нересту. Отбор проб мидий проводили в феврале и апреле. Моллюсков с длиной створки от 5 до 7 см в возрасте 2-х лет отбирали с фермы, расположенной в
35 б. Ласпи, с глубины 2 м. Пол и стадию зрелости гонад моллюсков определяли по 6-ти бальной шкале на мазке гонад с помощью микроскопа МБИ-6 [5]. Нерест моллюсков, проходящих 5-ю стадию репродуктивного цикла, вызывали по методике температурной стимуляции нереста [4]. Всего проанализировано 109 моллюсков.

После извлечения из морской воды мидий очищали от обрастаний и тщательно промывали фильтрованной морской водой. Моллюсков выдерживали в фильтрованной
40 морской воде в течение 12 часов (с полной сменой воды через 6 часов) для освобождения желудков от содержимого. В весенне-зимний период температура морской воды, в среднем, составляла 10-12°C, в осенний - 20°C. При этом, во время осеннего нереста, моллюсков, после освобождения желудков от содержимого, помещали на 2 часа в холодильник при температуре 5°C.

45 Нерест. Для стимуляции нереста мидий рассаживали по 1 экз. в пластмассовые стаканы емкостью 0,5 л с фильтрованной водой ($t_{\text{воды}}=18-20^{\circ}\text{C}$), поддерживая выбранную температуру в течение эксперимента. В течение нереста выделяемые моллюсками фекалии удаляли из сосудов при помощи дозатора. У самцов начало нереста отмечалось

через 15 мин. от момента стимуляции, у самок - через 20-30 мин. Общая продолжительность нереста в условиях эксперимента составляла в среднем 4-6 часов. Выметанные яйцеклетки сразу оседали на дно, образуя желто-оранжевый осадок, подвижные сперматозоиды оставались во взвешенном состоянии, образуя суспензию бело-кремового цвета. Чтобы исключить попадание в пробы гермафродитных особей, осуществляли контроль однородности полученных проб на мазке суспензии ПП под микроскопом. По окончании эксперимента мидий извлекали из стаканов и возвращали на мидийную ферму.

Количественный отбор яйцеклеток и сперматозоидов мидий. Для количественного отбора половых клеток, их отбирали на сито и промывали фильтрованной морской водой. Морскую воду фильтровали через ядерные мембраны с диаметром пор 1 мкм. Суспензию яйцеклеток переносили в чистый стакан, объемом 0,5 литров содержащий 200 мл фильтрованной воды. Для первой промывки использовали газ с диаметром ячеи 112 мкм, пропуская через него яйцеклетки в стакан с фильтрованной водой, при этом фекалии оставались на газе. На втором этапе яйцеклетки промывали через газ диаметром ячеи 56 мкм, яйцеклетки с небольшим количеством воды оставались на сите, далее их переносили в центрифужные пробирки ($V=15$ мл). Суспензию сперматозоидов дважды промывали фильтрованной морской водой объемом 200 мл, пропуская через газ диаметром ячеи 56 мкм. Фекалии оставались на сите, а спермин переходили в чистую воду. Затем половые клетки переносили в центрифужные стаканы ($V=200$ мл).

Осаждение половых клеток, очищение от морской воды и фекальных пеллет.

Для получения чистого материала применяли многократное центрифугирование. Яйцеклетки центрифугировали при скорости 3000 об./мин., вследствие чего половые клетки хорошо концентрировались, оболочка клеток не разрушалась и содержимое не переходило в раствор.

Скорости центрифугирования установлены авторами экспериментально, путем многократного исследования состава проб под микроскопом.

Поскольку сперматозоиды довольно подвижны и практически не оседают на дно сосуда, всю суспензию, полученную за время нереста, центрифугировали в стаканах ($V=200$ мл) при скорости 3500 об./мин. 3 раза по 10 минут до получения прозрачного раствора над осадком. Надосадочную жидкость удаляли, осадок суспензировали в небольшом количестве фильтрованной морской воды и переносили в пробирки ($V=15$ мл), оставляя на дне 0,1-0,2 мл пробы, содержащей посторонние примеси и вновь центрифугировали при 3000 об./мин.

При центрифугировании на дно пробирки вместе с половыми клетками оседали примеси фекалий моллюсков. Для получения чистых проб ПП суспензии клеток 4 раза переносили в чистые пробирки, оставляя на дне 0,05 -0,1 мл пробы, содержащей примеси. На заключительном этапе воду над осадком ПП максимально удаляли при помощи дозатора. В результате получали чистые однородные пробы живых клеток - сперматозоидов и яйцеклеток.

Масса половых продуктов, полученных от одной самки, достигала 360 мг сухого веса, у самцов - 70 мг сухого веса. Заявляемое изобретение было апробировано при выполнении исследований биохимического состава сперматозоидов и яйцеклеток мидий [1, 6, 7].

Литературные источники, принятые во внимание:

1. Караванцева Н.В., Поспелова Н.В., Бобко Н.И., Нехорошев М.В. Методика отбора половых продуктов мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. Системы контроля окружающей среды. - Севастополь, 2012. - Вып. 17. - С. 184-187.

2. Пиркова А.В. Размножение мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. и элементы биотехнологии ее культивирования: автореф. дисс. на соискание учен. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.18 «Гидробиология» / А.В. Пиркова. - Севастополь, 1994. - 25 с.

3. Cosson J., Groison A. - L., Suquet M. et al. Studying sperm motility in marine fish: an overview on the state of the art // J. Appl. Ichthyol. - 2008. - No 24. - P. 460-486.

4. Newel R., Thompson R. Reduced clearance rates associated with spawning in the mussel, *Mytilus edulis* (L) (Bivalvia, Mytilidae) / R. Newel, R. Thompson // Mar. Biol. Lett. - 1984. - Vol. 5, №1. - P. 21-23.

5. Пиркова А.В., Столбова Н.Т., Ладыгина Л.В. Сезонная динамика нереста мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. в иловых поселениях разных районах Черного моря // Гидробиол. журн. - 1994. - 30, №2. - С.22 - 27.

6. Караванцева Н.В. Половая структура мидий *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) обитающих у берегов Крыма // Экология моря. -2009. - Вып. 77. - С. 57-61.

7. Иванов В.К, Караванцева Н.В., Нехорошев М.В. Содержание липидов и каротиноидов в выметанных половых продуктах черноморской *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Мор. экол. журн. - 2009. - Т. 4, №1. - С. 84.

8. Холодов В.И. Выращивание мидий и устриц в Черном море /В.И. Холодов, А.В. Пиркова., Л.В Ладыгина / под ред. В.Н. Еремеева // Национальная академия наук Украины, Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского. - Севастополь. - 2010. - 424 с.

(57) Формула изобретения

Способ получения половых продуктов мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam., включающий отбор мидий, подготовку к нересту и температурную стимуляцию нереста, нерест с получением яйцеклеток и сперматозоидов, а также осаждение половых продуктов и очищение от биоотложений и морской воды путем 4-кратного центрифугирования на скорости 3000-3500 об/мин, причем половые продукты каждый раз помещают в чистые пробирки, а для яйцеклеток выбирают скорость центрифугирования 3000 об/мин, отличающийся тем, что после нереста мидий полученные половые продукты пропускают дважды через газ-сито, причем для яйцеклеток используют сито с диаметром ячеей 112 мкм и 56 мкм, а для сперматозоидов применяют газ-сито с диаметром ячеей 56 мкм, затем для осаждения и очищения сперматозоидов центрифугирование проводят 3 раза по 10 мин со скоростью 3500 об/мин и один раз со скоростью 3000 об/мин.

35

40

45