

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РФ**

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО РЫБОЛОВСТВУ**

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
“АЗОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА”  
(ФГБНУ «АЗНИИРХ»)**



## **АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ АКВАКУЛЬТУРЫ В СОВРЕМЕННЫЙ ПЕРИОД**

**МАТЕРИАЛЫ МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ**

**Г. РОСТОВ-НА-ДОНУ**

**28.09–02.10.2015 Г.**

**Ростов-на-Дону  
2015**

**THE RESULTS OF STUDIES OF AN INTRODUCED SO-IUY MULLET SPECIES  
*MUGILSOIUY BASILEWSKY, 1855=LIZA HAEMATOCHAILUS* (TEMMINCK ET,  
SCHLEGEL, 1845) AS AN OBJECT OF PASTURABLE FISH CULTURE IN THE  
ENCLOSED WATER BODIES OF THE PRE-SYVASH AREA**

**Turkulova V. N., Novosyolova N. V.**

***FSBSI «YugNIRO», Kerch, the Republic of Crimea, Russian Federation, vnt201055@mail.ru***

The main results of the YugNIRO studies of the introduced so-iuy mullet species as an object of pasturable fish culture in the enclosed water bodies of the pre-Syvash area are presented. Hydrochemical and hydrobiological regimes are described. The analysis of the influence of living conditions on the process of so-iuy mullet reproduction is given. The specific features of so-iuy mullet growth in the water bodies of various mineral contents are studied. The comparative data on fish productivity of so-iuy mullet two-yearlings in the conditions of their cultivation in polyculture with carp and herbivorous fish species are presented.

УДК 582.263:57.086.13

**КОНСЕРВАЦИЯ И ХРАНЕНИЕ МОРСКОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ  
*TETRASELMIS VIRIDIS***

**И.А. Харчук**

***ФГБУН Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН,  
Севастополь, Россия, seaferm@yandex.ru***

Исследовано влияние глицерина на биохимический состав микроводоросли *Tetraselmis viridis*. Зарегистрировано, что добавление глицерина в концентрации 10% от объёма культуральной среды, в качестве проникающего криопротектора, к клеткам *T. viridis* накануне замораживания способствует повышению синтеза хлорофиллов (на 23%), каротиноидов (на 34,6%), РНК (33,9%) и ДНК (12,5%) по сравнению с клетками без протекторов. При добавлении глицерина в концентрации 20% такого эффекта не выявлено. Установлено, что доля клеток *T. viridis*, сохранивших продукционные свойства после длительного хранения при отрицательных температурах (-14°C), в пробе без добавок составляла 3%, в пробе с 10% глицерином - 100%, с 20% глицерином - 90%.

Хранение клеток в замороженном состоянии обеспечивает долгосрочное сохранение культуры с поддержанием высокой жизнеспособности и предупреждение мутационных изменений, то есть в состоянии максимально близком к естественному. При низких температурах многие микроорганизмы переходят в состояние анабиоза, что сопровождается целым рядом конформационных физико-химических и биохимических изменений и перестроек, которые зависят как от самого вида, так и от условий, при которых происходила заморозка. Консервация микроводорослей с протекторами путём их замораживания позволяет сохранять их длительное время. Однако концентрация добавляемого протектора для каждого вида водорослей различна. Цель данной работы, на примере, зелёной микроводоросли *Tetraselmis viridis*, исследовать влияние протектора разной концентрации на содержание биохимических компонентов в клетках и сохранение их жизнеспособности при хранении в морозильной камере при температуре -14°C.

**Материалы и методы.** Объектом исследования была культура *Tetraselmis viridis* (штамм IBSS-25) из коллекции отдела биотехнологии и фиторесурсов ИМБИ РАН. Микроводоросли культивировали в накопительном режиме, при постоянном круглосуточном освещении и автоматическом перемешивании с использованием насоса для удаления избытка кислорода из среды и равномерного прогрева всего слоя питательного раствора культуры. Интенсивность света на поверхности раствора составляла 8 кЛк. Температура среды колебалась в диапазоне 25 - 29°C. В качестве питательной среды для *T. viridis* использовали среду Тренкеншу. Объём среды в культиваторах составлял 5 л, при высоте слоя раствора 45 см.

На стационарной фазе роста культуру микроводорослей разделяли на три равные части и к двум из них добавляли глицерин. Конечная концентрация которого составляла 10 и 20%. Клетки продолжали культивировать ещё в течение 24 ч. Затем проводили концентрирование клеток центрифугированием при 3000 об./мин на лабораторной центрифуге ОПН-3-УХЛ 42. Пасту водоро-

слей помещали в герметичные пластиковые боксы и ставили в морозильную камеру ( $-14^{\circ}\text{C}$ ). Перед замораживанием проводили биохимические исследования. Влажность в обезвоженных культурах определяли стандартным методом доведения до постоянной массы [4]. Пробы обрабатывали по схеме комплексного химического анализа гидробионтов [2]. Массовую долю белка в водорослях определяли по методике Лоури [8], содержание пигментов – спектрофотометрическими методами на приборе СФ - 2000 [1, 9]. Общее содержание липидов находили спектрофотометрическим методом с фосфованилиновым реактивом [5]. Определение углеводов проводили по методике Агатовой А. И. (2004) с L-триптофановым реактивом [5]. Количество свободных нуклеотидов (СН), РНК и ДНК определяли спектрофотометрическим методом [6]. Регистрируемые показатели химического состава выражали в пересчете на сухую массу.

Через 150 дней хранения водоросль реактивировали. Выявление живых и мертвых клеток микроводорослей проводили методом витального дифференциального окрашивания клеток, трипановым синим [4] с помощью светового микроскопа. Одновременно учитывали количество реактивируемых клеток и определяли долю жизнеспособных клеток. Под жизнеспособностью подразумевали способность микроводорослей эндогенно поглощать краситель. Критерием жизнеспособности также был рост микроводорослей на жидких питательных средах. Для количественного учёта роста микроводорослей в культуре использовали камеру Горяева [3].

**Результаты и обсуждение.** При сравнении биохимических показателей клеток *T. viridis* выявлено, что в культуре с 10% глицерином статистически значимо увеличивалось содержание ХЛ а - на 36% (рис. 1) и соответственно суммарных ХЛ а+в – на 23%, КР – на 34%, РНК – на 33% и ДНК – на 12% по сравнению с клетками водорослей культивируемых без добавок, и к которым добавляли 20% глицерин. В пробах без протектора и с 20% глицерином содержание ХЛ а, КР, РНК, ДНК и резервных углеводов статистически не отличались друг от друга. Так же обнаружено, что доля липидов и структурных углеводов с увеличением концентрации глицерина прибавляемого к клеткам *T. viridis* возрастала, а содержание свободных нуклеотидов (СН) наоборот снижалось. Вероятно, это связано с тем что глицерин являясь проникающим криопротектором, препятствует формированию кристаллов льда за счёт образования водородных связей с молекулами воды. Механизм действия глицерина на мембранном уровне не совсем ясен. Известно, что глицерин слабо влияет на свойства поверхности липидных монослоев и оказывает определенное действие на структуру мембраны. Глицерин в высоких концентрациях приводит к формированию новой гелевой фазы, в которой углеводородные хвосты липидов противоположных монослоев проникают друг в друга, что значительно снижает удельную емкость липидного слоя [7]. Из экспериментальных данных видно, что с увеличением концентрации вносимого в культуру глицерина доля липидов и структурных углеводов увеличивалась, это объясняется способностью глицерина повышать стабильность биомембран, путём образования слабых связей с кислородными атомами фосфатов, предотвращая денатурации структурных углеводов [3].

Клетки *T. viridis* были реактивированы после 150 суток хранения в морозильной камере. Количество жизнеспособных клеток в пробах, сохраняемых с глицерином, было в 2,5 раза выше, чем в пробе без добавления протектора (рис. 2). На второй день количество клеток в исследуемых образцах, сохраняемых с 20% глицерином и без него, снизилось на 9,32% и 97%, соответственно. В то время как в образце, замороженном с 10% глицерином, количество клеток увеличилось на 16,6%. На третий и последующие дни реактивации во всех пробах отмечено увеличение количества жизнеспособных клеток, за счёт их деления. Исследование динамики накопления биомассы реактивированных клеток *T. viridis* показало, что кривые роста идентичны (рис. 3). В качестве контрольной культуры взяты водоросли не подвергавшиеся замораживанию. Выявлено, что максимальная продуктивность на линейной стадии роста в культурах подлежащих замораживанию с глицерином была выше, чем у культуры сохраняемой без добавок. Таким образом, глицерин, являясь проникающим криопротектором способствует сохранению клеточной структуры водорослей во время длительного хранения при температуре  $-14^{\circ}\text{C}$ . Однако, необходимо учитывать его концентрацию при добавлении, так как в большом количестве глицерин действует угнетающе на клетки водорослей. Доля клеток *T. viridis*, сохранивших продукционные свойства, в пробе без добавок составляла 3%, в пробе с 10% глицерином - 100%, с 20% глицерином – 90%.

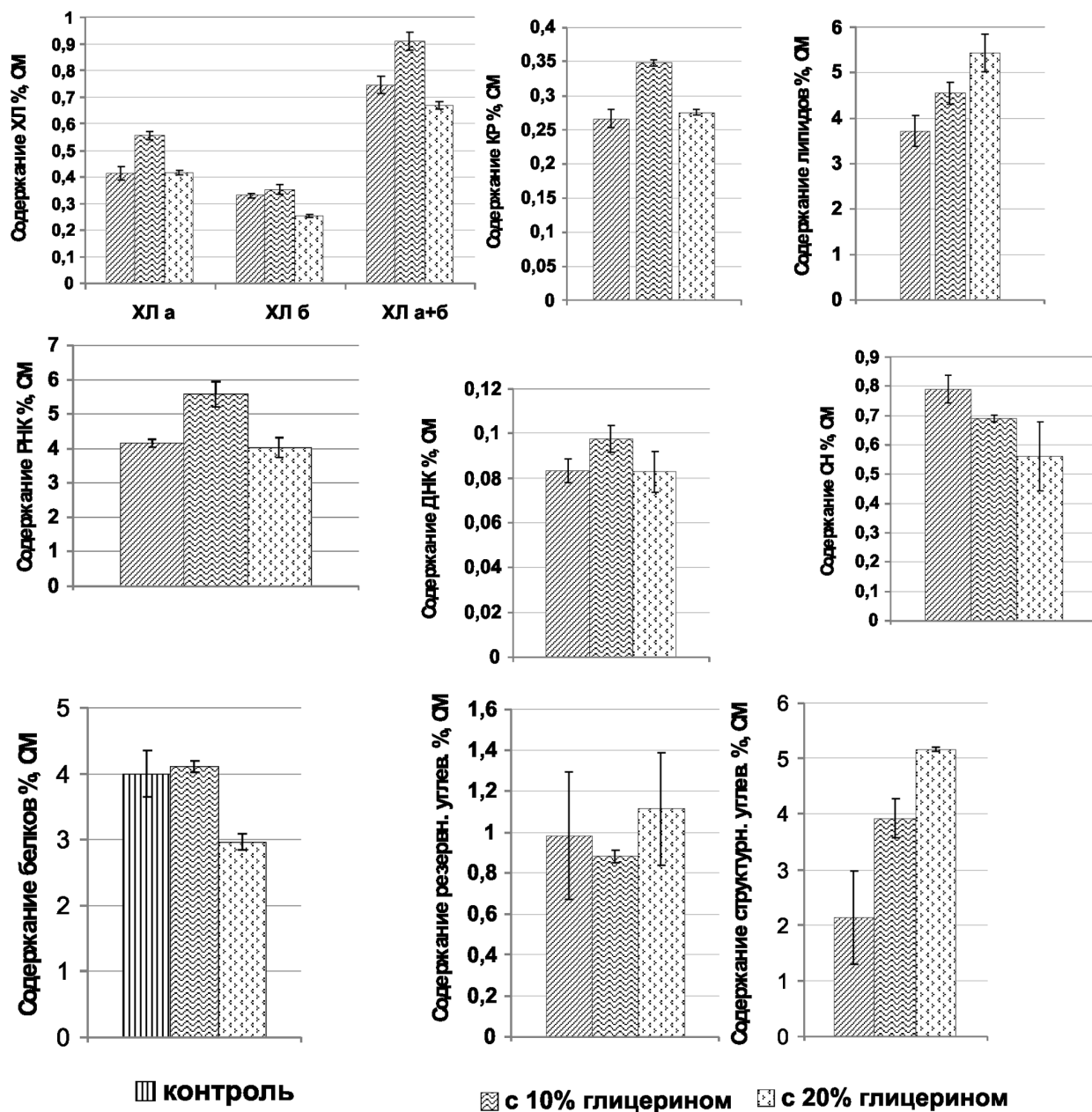


Рисунок 1. Содержание компонентов биохимического состава в клетках *Tetraselmis viridis* в зависимости от используемого протектора (контроль микроводоросль замороженная без добавок)

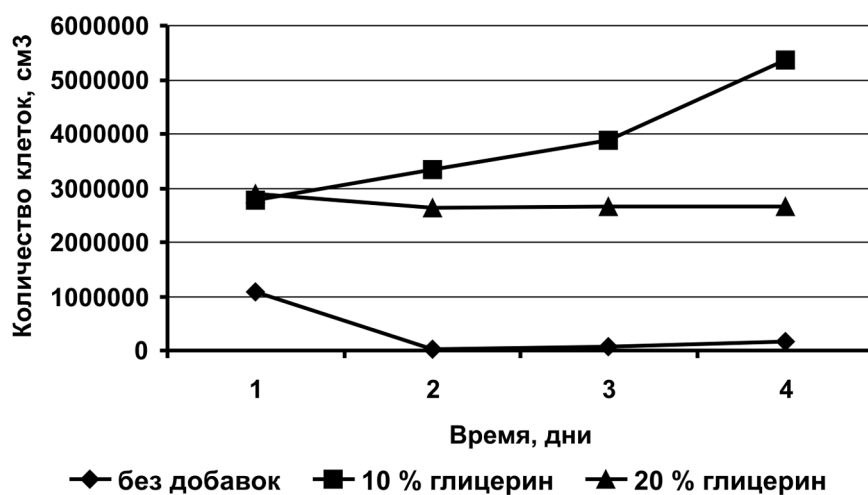


Рисунок 2. Динамика жизнеспособных клеток в процессе реактивации культур *Tetraselmis viridis*

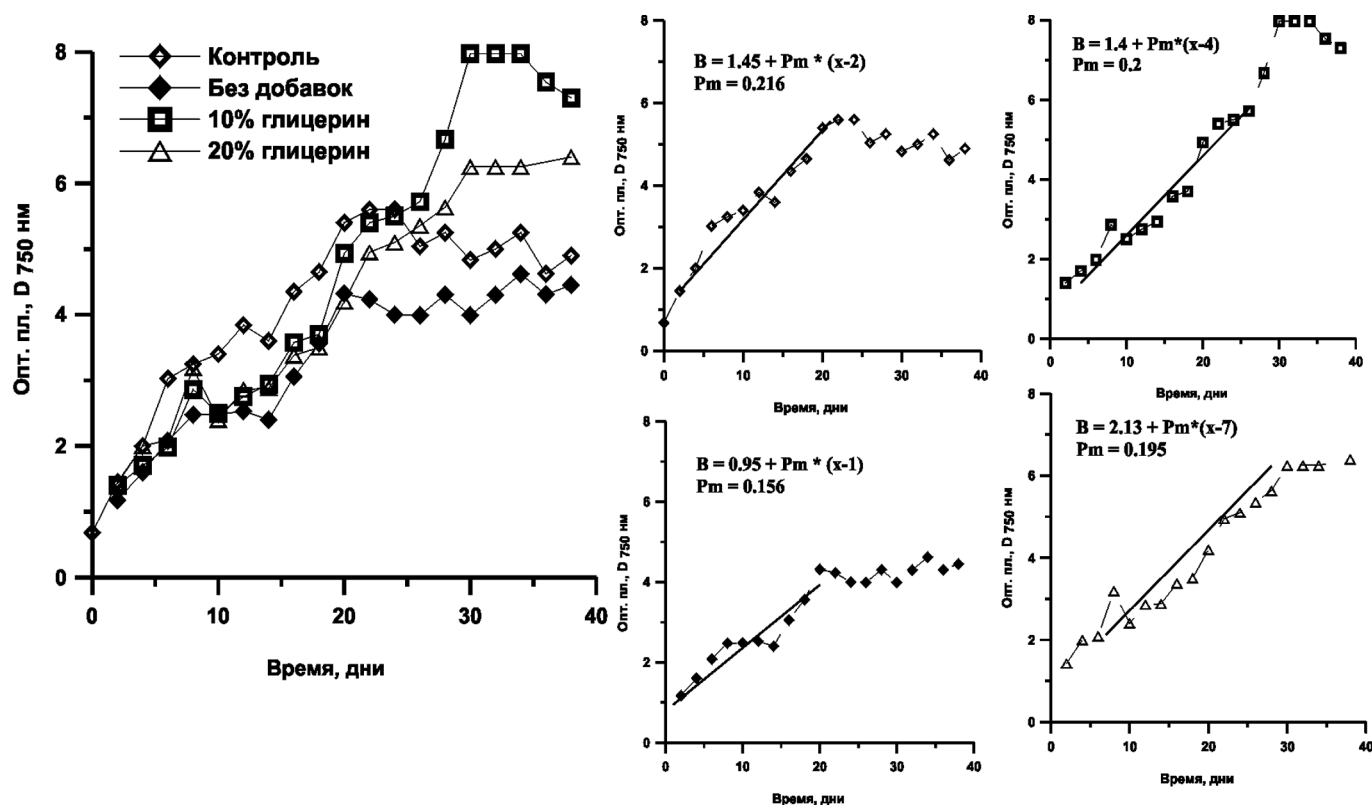


Рисунок 3. Динамика биомассы накопительных культур *Tetraselmis viridis* после реактивации

**Заключение.** 1. Зарегистрировано, что добавление глицерина в концентрации 10% от объёма культуральной среды, в качестве проникающего криопротектора, к клеткам микроводоросли *Tetraselmis viridis* накануне замораживания способствует повышению синтеза ХЛ, КР, РНК и ДНК по сравнению с клетками без протекторов. При добавлении глицерина в концентрации 20% такого эффекта не обнаружено. 2. Выявлено, что наибольшая доля жизнеспособных клеток находится в пробах, к которым добавляли глицерин.

#### Список литературы

1. Большой практикум по физиологии растений. / под ред. Б. А. Рубин – М. : Высш. Шк., 1975. – 439 с.
2. Копытов Ю. П. Схема комплексного биохимического анализа гидробионтов / И. А. Дивавин, И. М. Цымбал // Материалы конф. «Рациональное использование ресурсов моря – важный вклад в реализацию продовольственной программы» // АН УССР. ИнБЮМ. – Севастополь, 1985. – 4.2. – С. 227–231. – Деп. В ВИНТИ 16.04.85, № 2556 – 85.
3. Криопротекторы / Н. С. Пушкарь, М. И. Шраго, А. М. Белоус, Ю. В. Калугин — Киев: Наук. думка. 1978. — 204 с.
4. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике / отв. ред. А. В. Топачевский – Киев : Наук. думка, 1975. – 247 с.
5. Руководство по современным биохимическим методам исследования водных экосистем, перспективных для промысла и марикультуры // под ред. А.И. Агатова, - Изд-во ВНИРО, 2004.
6. Спирин А. С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот / А. С. Спирин // Биохимия. – 1958. – Т. 23, № 5. – С. 656–662.
7. Demel R.A. The function of sterols in membranes / R.A. Demel, B. De Kruijff // Biochim. Biophys. Acta. - 1976. - Vol. 457. - P. 109- 132.
8. Protein measurement with folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Faar et all. // Journ. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265–275.
9. Rowan K. S. Photosynthetic Pigments of Algae / K. S. Rowan // Cambridge : Cambridge Univ. Press, 1989. – 334 p.

## PRESERVATION AND STORAGE OF MARINE MICROALGAE TETRASELMIS VIRIDIS

Kharchuk I.A.

*A.O. Kovalevsky Institute of Marine Biological Research RAS, Sevastopol, Russia, seaferm@yandex.ru*

The effect of glycerin on the biochemical composition of microalgae *Tetraselmis viridis* was investigated. It was registered that the addition of glycerin at a concentration of 10% of the volume of culture medium as

a penetrating cryoprotector to cells *T. viridis* before freezing promotes the synthesis of chlorophyll (23%), carotenoids (34.6%), RNA (33,9 %) and DNA (12.5%) compared to cells without protectors. On addition of glycerin at a concentration of 20% there was no such effect. It was found the percentage of *T. viridis* cells which kept productional properties after long-term storage at low temperatures (-14°C) was 3% in the sample without additives, 100% in the sample with 10% glycerin, 90% in the sample with 20% glycerin.

УДК 594.124:577.1(262,5)

## АНАЛИЗ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ, ПОЛОВОЙ СТРУКТУРЫ И СТАДИЙ ЗРЕЛОСТИ ГОНАД КОЛЛЕКТОРНОЙ МИДИИ *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* НА КРЫМСКОМ ПОБЕРЕЖЬЕ

Н.С. Челябинна

ФГБУН Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН,  
Севастополь, Россия, [chelydina2007@mail.ru](mailto:chelydina2007@mail.ru)

Проведён анализ фенотипической, половой структуры и стадий зрелости гонад коллекторной мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam, культивируемой на фермах крымского побережья Чёрного моря. Показано, что в выборках мидий 30 и 50 мм преобладали моллюски с чёрной окраской раковины, независимо от принадлежности к размерным группам и районам обитания. Отмечен сдвиг половой структуры в сторону самцов, наиболее выраженный у мидий с длиной раковины 30 мм. Показана асинхронность созревания гонад обоих полов. Самцы обеих размерных групп мидий, взятые из разных мест обитания, имели большую вариабельность по стадиям зрелости, чем самки. Гонады самцов находились на более зрелой стадии репродуктивного цикла, чем гонады самок.

Мидия *Mytilus galloprovincialis* образует в Чёрном море большие скопления и её относят к средообразующим видам. До 80-х годов XX ст. мидия входила в число промысловых объектов на Чёрном море, а её запасы исчислялись миллионами тонн [5]. Однако в настоящее время её численность в акватории моря значительно снизилась [5, 8]. Несмотря на то, что существуют различные точки зрения о влиянии мидийных ферм на состояние окружающей среды, мировой опыт культивирования видов рода *Mytilus* свидетельствует об экономической целесообразности их выращивания. Совершенствование биотехнологии выращивания мидии включает и селекционную работу, для которой важен анализ фенотипической структуры поселений мидий в Чёрном море, как один из аспектов мониторинга состояния популяции моллюска в изменяющихся условиях среды [11]. Установление факта наследственной обусловленности полиморфизма окраски раковины важен, так как подводит генетический фундамент под многочисленные популяционные исследования *M. galloprovincialis*, использующих признаки окраски раковины в качестве маркеров физиологических процессов [7, 9]. Сведения о закономерностях реализации пола в определённых условиях так же могут быть основой активного управления формированием поселений при культивировании моллюсков. Следует отметить, что при выращивании мидий в марихозяйствах полициклического типа важным условием является наличие надёжного источника спата, которым является природная популяция мидий. Для этого необходимо располагать детальной информацией о закономерностях полового созревания мидий, стадиях развития гонад и вымете половых продуктов [2].

Целью работы было оценить фенотипическую, половую структуру поселений мидий и стадии зрелости гонад коллекторной мидии *M. galloprovincialis* из разных мест обитания.

Экспериментальную часть работы проводили посезонно в течение 2003 – 2011 гг. Объектом исследования был двустворчатый моллюск *M. galloprovincialis* с размером раковины 30,20±0,02 и 50,30±0,04 мм., культивируемый на фермах крымского побережья, расположенных в районе внешнего рейда г. Севастополя, бухтах Мартынова и Ласпи. Данный выбор позволил ограничить вариабельность моллюсков по длине раковины. У моллюсков определяли окраску раковины, пол и стадию зрелости гонад. Окраску раковины моллюска определяли по методике, предложенной Драголи [1]. Для определения пола и стадии зрелости гонад использовали методику визуального изучения мазков гонад под бинокуляром МБИ-6 [6]. Всего было обработано 7670 экземпляров моллюсков.