

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 47, номер 1, 2021

---

---

## Обзор

- Полисахариды морских водорослей в современных технологиях регенеративной медицины  
*Т. А. Кузнецова, Б. Г. Андрюков, Н. Н. Беседнова, Ю. С. Хотимченко* 3
- Материалы, методы и эксперименты, применяемые при изучении черноморских альговирусов  
*О. А. Степанова, П. В. Гайский, С. А. Шоларь* 13
- 

## Оригинальные статьи

- Половое воспроизведение и жизненный цикл пеннатной диатомовой водоросли *Entomoneis cf. paludosa* (W. Smith) Reimer (Bacillariophyta)  
*Ю. А. Подунай, Н. А. Давидович, О. И. Давидович, А. Витковский, Р. Гастиньо, Ч. Н. Солак* 23
- Находки темного окуня *Sebastes schlegelii* Hilgendorf, 1880 в Чёрном море  
*Е. П. Карпова, И. Ю. Тамойкин, В. С. Кулешов* 34
- Токсичные метаболиты микромицетов в бурых водорослях семейств Fucaceae и Laminariaceae из Белого моря  
*А. А. Буркин, Г. П. Кононенко, А. А. Георгиев, М. Л. Георгиева* 40
- Пространственное распределение, рост и размножение двустворчатого моллюска *Macosoma calcarea* (Gmelin, 1791) у берегов Новой Земли  
*А. Э. Носкович* 45
- Размерно-возрастная структура, рост и созревание пятнистого сома *Arius maculatus* (Thunberg, 1792) (Siluriformes: Ariidae) из эстуария реки Меконг (Вьетнам)  
*Д. Н. Куцын, Э. Р. Аблязов, Ба Хай Чыонг, Нгуен Динь Ку* 54
- 

## Краткие сообщения

- Использование дистанционного наблюдения для мониторинга состояния репродуктивной группировки ларги *Phoca largha* Pallas, 1811 в заливе Петра Великого Японского моря  
*И. О. Катин, В. А. Нестеренко* 63
- Первое обнаружение нерестилища ската Таранца *Bathyraja taranetzi* (Dolganov, 1983) и фиолетового ската *B. violacea* (Suvogov, 1935) в тихоокеанских водах северных Курильских островов  
*А. А. Баланов, В. В. Панченко, А. Б. Савин* 67
- 
-

# Contents

---

---

Volume 47, No 1, 2021

---

---

## Review

- Polysaccharides from Marine Algae in Modern Technologies of Regenerative Medicine  
*T. A. Kuznetsova, B. G. Andryukov, N. N. Besednova, Y. S. Khotimchenko* 3
- Materials, Methods and Experiments in the Study of the Black Sea Algal Viruses  
*O. A. Stepanova, P. V. Gaisky, S. A. Sholar* 13
- 

## Original papers

- Sexual Reproduction and Life Cycle of the Pennate Diatom *Entomoneis* cf. *paludosa* (W. Smith) Reimer (Bacillariophyta)  
*Yu. A. Podunay, N. A. Davidovich, O. I. Davidovich, A. Witkowski, R. Gastineau, C. N. Solak* 23
- Findings of the Korean Rockfish *Sebastes schlegelii* Hilgendorf, 1880 in the Black Sea  
*E. P. Karpova, I. Yu. Tamoykin, V. S. Kuleshov* 34
- Toxic Metabolites of Micromycetes in Brown Algae of the Family Fucaceae and Laminariaceae from the White Sea  
*A. A. Burkin, G. P. Kononenko, A. A. Georgiev, M. L. Georgieva* 40
- The Spatial Distribution, Growth, and Reproduction of the Bivalve *Macoma calcareo* (Gmelin, 1791) off the Novaya Zemlya Coast  
*A. E. Noskovich* 45
- The Size–Age Structure, Growth, and Maturation of the Spotted Catfish *Arius maculatus* (Thunberg, 1792) (Siluriformes: Ariidae) from the Mekong Delta, Vietnam  
*D. N. Kutsyn, E. R. Ablyazov, Ba Hai Truong, Nguyen Dinh Cu* 54
- 

## Brief notes

- The Use of a Remote Surveillance System for Monitoring the Reproductive Grouping of the Spotted Seal *Phoca largha* Pallas, 1811 in Peter the Great Bay, Sea of Japan  
*I. O. Katin, V. A. Nesterenko* 63
- The First Record of Spawning Ground of the Mud Skate *Bathyraja taranetzi* (Dolganov, 1983) and the Okhotsk Skate *B. violacea* (Suvorov, 1935) in Pacific Waters off the Northern Kuril Islands  
*A. A. Balanov, V. V. Panchenko, A. B. Savin* 67
- 
-

УДК 616.089.44-616.001.45:577.11-67.02+67.03

## ПОЛИСАХАРИДЫ МОРСКИХ ВОДОРОСЛЕЙ В СОВРЕМЕННЫХ ТЕХНОЛОГИЯХ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ<sup>1</sup>

© 2021 г. Т. А. Кузнецова<sup>1, \*</sup>, Б. Г. Андрюков<sup>1</sup>, Н. Н. Беседнова<sup>1</sup>, Ю. С. Хотимченко<sup>2, 3</sup>

<sup>1</sup>НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток 690087, Россия

<sup>2</sup>Дальневосточный федеральный университет, Школа биомедицины, Владивосток 690091, Россия

<sup>3</sup>Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток 690041, Россия

\*e-mail: takuznets@mail.ru

Поступила в редакцию 18.03.2020 г.

После доработки 14.09.2020 г.

Принята к публикации 25.09.2020 г.

В обзоре дана характеристика физико-химических и биологических свойств полисахаридов (ПС) морских водорослей (бурые водоросли – альгинаты и фукоиданы, красные – каррагинаны, зеленые – ульваны), применяющихся в современных технологиях регенеративной медицины. Представлены сведения о разных типах биосовместимых раневых покрытий на основе ПС водорослей (мембраны, пены, гидрогели, нановолокна, губки), проанализированы результаты экспериментальных и клинических испытаний покрытий при лечении ран различного генеза. Особое внимание уделено способности ПС формировать гидрогели, так как именно гидрогелевые покрытия соответствуют основным требованиям, предъявляемым к идеальному раневому покрытию. Приведены примеры использования ПС водорослей в тканевой инженерии и для модуляции систем доставки лекарств. Обсуждаются современные тенденции в разработке материалов нового поколения для создания на основе ПС систем доставки лекарственных препаратов и тканево-инженерных конструкций, позволяющих генерировать ткани, специфичные для человека, а также разрабатывать мишень-ориентированные и персонализированные продукты регенеративной медицины.

*Ключевые слова:* полисахариды морских водорослей, альгинаты, фукоиданы, каррагинаны, ульваны, гидрогели, раневые покрытия, регенерация тканей

DOI: 10.31857/S013434752101006X

Водоросли, обладающие комплексом уникальных свойств, не присущих растительному миру суши, в настоящее время используются в разных областях деятельности человека, в первую очередь, в пищевой, медицинской и фармацевтической промышленности. В последние годы особое внимание исследователей привлекают полисахариды (ПС) водорослей. Благодаря уникальной структуре, имитирующей человеческий межклеточный матрикс, широкому спектру биологической активности, коллоидным свойствам и способности набухать, удерживая влагу, а также высокой биосовместимости и низкой токсичности, ПС водорослей нашли применение в технологиях регенеративной медицины, в том числе при конструировании раневых покрытий. На основе ПС разработаны раневые покрытия разных типов с широкими возможностями применения.

Современные технологии позволили создать на основе ПС уникальные материалы нового поколения для модуляции систем контролируемой доставки лекарств, имплантируемых медицинских устройств, трансплантатов органов и тканей. Сочетание физико-химических и биологических свойств ПС и синтетических полимеров открывает возможности для технологий тканевой инженерии в области реконструктивной и трансплантационной хирургии. Тканевая инженерия направлена на создание жизнеспособных биологических структур, воспроизводимых с помощью трехмерной (3D) биопечати с использованием биосовместимых материалов (комбинаций различных биополимеров и синтетических полимеров), которые могут включать живые клетки (Jovic et al., 2019; Bilal, Iqbal, 2020). Полученные из красных, бурых и зелёных морских водорослей сульфатированные ПС хорошо изучены и считаются наиболее перспективными для применения в этих технологиях.

<sup>1</sup> Публикуется в связи с 50-летием Института биологии моря (в настоящее время – ННЦМБ им. А.В. Жирмунского ДВО РАН).

### *Раневой процесс и современные тенденции конструирования раневых покрытий*

Рана – это повреждение тканей и/или органов, которое сопровождается нарушением целостности покровных тканей (кожи, слизистых оболочек). Общепринятой классификации ран не существует. Разные способы типологизации ран (по этиологии, локализации, типу повреждения, глубине, степени сложности и инфицированности и т.д.) помогают охарактеризовать рану для проведения ее адекватного лечения. При оценке раны наибольшее значение имеют характер и этиология травмы, время ее возникновения, глубина повреждения кожи и подлежащих тканей (Dhivya et al., 2015; Pozharitskaya et al., 2019). Понимание основных механизмов ранозаживления, а также знание типа и функции доступных перевязочных материалов позволяют комплексно подходить к выбору перевязочных материалов и разработке индивидуального плана лечения пациентов. В ходе лечения при выборе необходимого раневого покрытия учитываются многие факторы, в том числе общее состояние здоровья пациента, степень сложности раны и ее этиология, фаза раневого процесса. На всех этапах лечения важно соблюдение ключевых требований, предъявляемых к покрытиям: обеспечение оптимального газообмена и влажной среды в ране, биологической совместимости, отсутствия аллергических реакций и раздражения. Современные перевязочные материалы должны быть многофункциональными (Mayet et al., 2014; Boateng, Catanzano, 2015).

Существует широкий ассортимент перевязочных (ранозаживляющих) средств. Анализ многочисленных публикаций (Mayet et al., 2014; Boateng, Catanzano, 2015; Dhivya et al., 2015; Bilal, Iqbal, 2020) позволил обобщить основные требования, предъявляемые к современным раневым покрытиям. Это биологическая совместимость, минимальная адгезия к поверхности раны, адсорбционное действие для удаления избытка раневого экссудата и присутствующих в нем токсичных компонентов, способность при необходимости оказывать гемостатическое действие, а также участвовать в газообмене и поддерживать оптимальную влажность на раневой поверхности. Раневые покрытия должны обеспечивать теплоизоляцию, обладать эластичностью и паропроницаемостью при сохранении непроницаемости для микроорганизмов, легко подвергаться стерилизации и разлагаться. При выборе покрытия большое значение имеют возможность его применения без дополнительной фиксации, а также прочность и эффективность при достаточной дешевизне материала.

Современные тенденции при конструировании раневых покрытий направлены на использование биополимеров и синтетических полимеров

в форме гидрогелей, тонких пленок (мембран), нановолокон, вафельных покрытий и пен. При рассмотрении структурных вариантов раневых покрытий особого внимания заслуживают гидрогелевые покрытия.

### *Гидрогели*

Гидрогели считаются перспективными биоматериалами для биомедицинского применения в разных областях медицины – от раневых повязок для гемостаза до доставки лекарств и тканевой инженерии, самовосстанавливающихся материалов и биосенсоров. Считается, что именно гидрогели обладают свойствами идеального раневого покрытия.

Гидрогели представляют собой трехмерные структуры, изготовленные из гидрофильных полимерных цепей с соответствующими структурой и свойствами. Наличие трехмерного полимерного каркаса придает гелям механические свойства твердых тел (отсутствие текучести, способность сохранять форму, прочность и способность к деформации, пластичность и упругость). Гидрогели напоминают экстрацеллюлярный матрикс кожи, включающий коллагеновые и эластиновые волокна, глюкозаминогликаны и протеоглики, неколлагеновые структурные белки и минеральные компоненты, поэтому они способны выполнять функции, присущие межклеточному матриксу (Gaharwar et al., 2014; Venkatesan et al., 2016; Annabi et al., 2017; Lokhande et al., 2018; Mishra et al., 2019).

В последние 15 лет многие исследования сосредоточены на разработке материалов для локальной доставки лекарств к намеченным мишеням на основе многофункциональных соединений, которые способствуют стабилизации и контролируемому высвобождению лекарств, а также обеспечивают их биосовместимость. В качестве систем доставки лекарств (например, антибактериальных или противовоспалительных средств, протеолитических ферментов, факторов роста и биологически активных веществ) гидрогели привлекают внимание благодаря своей высокопористой структуре, позволяющей загружать в матрицу геля лекарство с его последующим постепенным высвобождением. Системы доставки лекарств на основе гидрогелей включают нано- или микрочастицы, нановолокна, микросферы и микроиглы. Нано- и микрочастицы обладают рядом преимуществ: доступность для доставки при разных путях введения, адаптация размера частиц и характеристик поверхности, а также возможность контролируемого и длительного высвобождения лекарственного средства в необходимых мишенях (Venkatesan et al., 2016; Annabi et al., 2017; Shafei et al., 2019). Появление носителей в форме микрочастиц открыло новые возможности для



разработки систем доставки лекарств с улучшенными фармакокинетическими и фармакодинамическими свойствами. Нановолокна, обладающие большим отношением площади их поверхности к объему, считаются подходящими субстратами в тех случаях, когда желательна высокая пористость. В отличие от обычных жестких пористых структур, носители из нановолокна представляют собой динамические системы, в которых размер и форма пор могут изменяться, создавая гибкую или жестко сшитую структуру. Как правило, нановолокна находят применение для капсулирования и контролируемого высвобождения лекарств, а также в тканевой инженерии, в частности в 3D-биопечати. Трехмерная (3D) биопечать – это быстро развивающаяся область биомедицины, в которой используются биосовместимые материалы (комбинации различных биополимеров и синтетических полимеров), в том числе живые клетки, для создания жизнеспособных биологических структур с необходимым пространственным расположением. Конечный продукт 3D-биопечати имплантируется в организм и в течение нескольких месяцев заменяется собственной тканью. Эта технология позволяет развиваться таким областям медицины, как реконструктивная и трансплантационная хирургия, имплантируемые медицинские устройства, контролируемая доставка лекарств (Gaharwar et al., 2014; Jovic et al., 2019; Mishra et al., 2019; Bilal, Iqbal, 2020).

Таким образом, современные тенденции при разработке материалов нового поколения для конструирования раневых покрытий, систем доставки лекарственных препаратов и имплантируемых конструкций представлены стратегиями, включающими применение новых полимерных материалов, сочетающих необходимые физико-химические и биологические свойства. Такой подход способен обеспечить биосовместимые и биоразлагаемые природные биополимеры из морских гидробионтов. Среди них наибольший интерес представляют ПС из морских водорослей: альгинаты и фукоиданы бурых водорослей, каррагинаны красных водорослей и ульваны зеленых водорослей.

### *Альгинаты*

Альгинаты – смешанные соли натрия и/или калия, кальция и магния альгиновой кислоты. Альгиновая кислота – природный ПС, получаемый преимущественно из бурых водорослей родов *Laminaria*, *Ascophyllum* и *Fucus*. Альгинаты представляют собой линейные кислые ПС, состоящие из центрального остова  $\alpha$ -L-гулуруновой кислоты (блоки G),  $\beta$ -D-маннуруновой кислоты (блоки M), а также обычно перемежающихся альтернативных остатков L-гулуруновой и D-маннуруновой кислот (блоки GM) (см.: Rupérez et al.,

2013; Venkatesan et al., 2015; Axpe, Oyen, 2016; Stöblein et al., 2019).

Использование альгинатов в качестве потенциальных материалов в современных биотехнологиях связано с их уникальными свойствами, такими как высокая биологическая активность, биосовместимость, биоразлагаемость и нетоксичность, отсутствие иммуногенности, высокая абсорбционная способность и способность перерабатываться в гидрогель, а также с низкой стоимостью производства (Thomas, 2000; Murakami et al., 2010; Sudarsan et al., 2015; Ching et al., 2017). Наиболее важным в этом аспекте является свойство альгинатов в водных растворах образовывать гидрогели при добавлении солей бивалентных металлов. Гиалуруновая кислота образует более твердые гели, чем маннуруновая кислота, которая формирует мягкие гели (Murakami, et al., 2010; Stöblein et al., 2019). Из-за гелеобразующего свойства альгинаты являются одним из наиболее широко используемых биополимеров с широким спектром применения, включая раневые покрытия, доставку лекарств и тканевую инженерию (Rupérez et al., 2013; Cardoso et al., 2016). Спектр биологического действия полимерной матрицы гидрогеля может быть расширен за счет использования композиций на основе смесей альгината с другими как природными (хитозан, гиалуруновая кислота, коллаген, фибрин, желатин, целлюлоза), так и синтетическими биополимерами (Murakami et al., 2010; Saarai et al., 2012; Straccia et al., 2015).

Следует отметить, что на основе альгинатов производится большинство представленных на рынке коммерческих перевязочных материалов (Альгимаф, Пальма ООО ГК; Альгипор, Пальма ООО ГК; Биокол, ООО Биокол; Algicell™, Integra LifeSciences Corp; Biatain™, Coloplast; Comfeel Plus™, Coloplast; Fibracol, Systagenix; Kaltostat®, ConvaTec; Maxorb® ES, Medline Industries Inc.; Nu-derm™, KCI, An Acelity Company; Sorbalgon®, Hartmann Inc.; Suprasorb®, L&R Inc. и др.).

Применяемые на практике альгинатные гидрогели представлены в виде мембран или пленок, пен, нановолокон, губок и т.д. (Sudarsan et al., 2015). Пленки на основе альгината натрия в комбинации с другими полимерами способны улучшать процесс заживления ран, обеспечивая проницаемость для водяного пара, углекислого газа и кислорода, а также защищают рану от бактериальных инфекций. Пены на основе альгинатов – это твердые пористые матрицы, которые подвергаются стерилизации и при введении в рану не причиняют пациенту дискомфорта. Пены характеризуются увеличенным временем гидратации и могут быть удалены из раны без серьезного повреждения ткани; они способны поглощать экссудат, защищать рану от мацерации, улучшать га-

зоообмен и создавать влажную среду для раны. Однако при использовании пен требуется частая перевязка. Пены не подходят для сухих ран, а также ран с незначительным экссудатом (Dhivya et al., 2015). Нановолокна, полученные из альгината натрия, имитируют внеклеточный матрикс, создавая условия для усиления пролиферации эпителиальных клеток и образования новой ткани. Они также улучшают абсорбцию жидкости, способствуют гемостазу поврежденных тканей, доставке через кожу лекарств, дыханию клеток и проникновению большого количества газа, предотвращая тем самым бактериальные инфекции (Andreu et al., 2015; Hu et al., 2015; Hajiali et al., 2016). Вафельные покрытия получают путем лиофилизации растворов альгинатов в сочетании с другими полимерами; в результате образуются твердые пористые структуры, похожие на пенные повязки, которые можно наносить на экссудирующие поверхностные раны (Matthews et al., 2005; Boateng et al., 2015).

Альгинатные гидрогели — наиболее перспективные материалы как носители для доставки лекарств (Sun, Tan, 2013; Xing et al., 2019). Сообщается об использовании в качестве системы доставки белка для инженерии мягких тканей ковалентно сшитого композитного гидрогеля, полученного смешиванием водорастворимых производных альгината и хитозана без добавления химических сшивающих агентов, заключенного в микросферы (Xing et al., 2019). Для эффективного ранозаживления и подавления микрофлоры использовали лиофилизированные пены, содержавшие альгинат натрия и желатин, нагруженные сульфадиазином серебра (Boateng et al., 2015), а также вафельные покрытия, содержавшие альгинат натрия и гуаровую смолу, нагруженные антибиотиками (Gowda et al., 2016). Вафельные покрытия на основе альгината натрия, каррагинана и полиокса, содержавшие стрептомицин и диклофенак, применяли для лечения хронических ран (Pawar et al., 2014).

Альгинаты широко используются в тканевой инженерии, в частности в 3D-биопечати. О высокой эффективности биосовместимых каркасов на основе альгинатных гидрогелей в тканевой инженерии и регенеративной медицине свидетельствуют многочисленные сообщения последних лет (Yu et al., 2013; Ахре, Оуен, 2016; Solovieva et al., 2018; Jovic et al., 2019; Xing et al., 2019).

### Фукоиданы

Фукоиданы — сульфатированные ПС, входящие в состав клеточных стенок бурых водорослей рода *Fucus*. Это фукозосодержащие гомо- и гетерополисахариды как с высоким содержанием уроновых кислот и низким содержанием фукозы и сульфатов, так и практически чистые  $\alpha$ -L-фу-

каны, где основным компонентом молекул является фукоза. Кроме фукозы в их составе могут содержаться небольшие количества других моносахаридов (галактоза, манноза, ксилоза, глюкоза), а также сульфаты, уроновые кислоты, ацетильные группы и белок (Cunha, Grenha, 2016; Menshova et al., 2016; Slima et al., 2019). Со структурными особенностями фукоиданов, имитирующих структуру гликозаминогликанов млекопитающих, связаны разнообразные биологические эффекты, которые наряду с высокой биосовместимостью и отсутствием токсичности представляют интерес для разработки нового поколения полимерных материалов. При этом ключевыми свойствами фукоиданов являются антиоксидантные, иммуномодулирующие, ангиогенные, антикоагулянтные и антивирусные/антибактериальные (Purnama et al., 2015; Menshova et al., 2016; Park et al., 2017; Wang et al., 2018; Pozharitskaya et al., 2019; Slima et al., 2019).

Уникальные биологические свойства делают фукоидан полезным компонентом в составе гидрогелей, несмотря на отсутствие у него способности к гелеобразованию. Это ограничение можно преодолеть, комбинируя фукоидан с полимерами (хитозан и его производные) или с другими соединениями, обеспечивающими положительный заряд, среди которых, например, протамин, полиэтилениамин, гидрохлорид полиалкиламина, поли(изобутилцианоакрилат), поли(лактид-когликолид), поли-1-оритин и гексадециламин, поли(алкилцианоакрилат) и др. (Citkowska et al., 2019). Многочисленные работы свидетельствуют о высокой эффективности гелей и био пленок, содержащих фукоидан в качестве ранозаживляющего средства (Sezer et al., 2008; Murakami et al., 2010; Yanagibayashi et al., 2012, и др.). Установлено оптимальное соотношение компонентов гидрогеля, полученного из фукоидана и хитозана; отмечено, что структура и эффективность геля улучшались при увеличении концентрации фукоидана (Sezer et al., 2008). Положительную оценку получил ранозаживляющий потенциал гидрогелевых пленок с фукоиданом, усиленных поливинилом (Feki et al., 2020). Пленки гидрогеля на основе хитозана, фукоидана и альгината, сшитые диглицидиловым эфиром этиленгликоля, характеризовались лучшей и более продолжительной способностью к абсорбции экссудата по сравнению с таковой у коммерческого препарата (Kaltostat<sup>®</sup>, ConvaTec), представляющего альгинатное волокно (Murakami et al., 2010).

Из-за способности взаимодействовать с факторами роста и меньшей, чем у гепарина, антикоагулянтной активности фукоидан использовали при создании лекарственного носителя для регенерации тканей. Разработан комплексный хитозан/фукоидан гидрогель для инъекций, который, взаимодействуя с фактором роста фибробластов-2 (FGF-2), существенно продлевает его период

полужизни, усиливает активность и защищает FGF-2 от инактивации, например, нагреванием и протеолизом. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* комплексный гидрогель контролируемо высвобождал активные молекулы FGF-2, способствуя значительной неоваскуляризации, при этом гидрогель подвергался биоразложению и исчезал через четыре недели (Nakamura et al., 2008).

Современные тенденции развития технологий полимерных материалов предусматривают использование при конструировании трехмерных каркасных структур разных комбинаций фукоидана с хитозаном, желатином, альгинатом или гидроксипапатитом (Purnama et al., 2015; Lowe et al., 2016). Полимерные каркасы на основе хитозан–альгинат с фукоиданом характеризуются как перспективные биоматериалы для регенерации костной ткани или как заменители костного трансплантата (Lowe et al., 2016; Venkatesan et al., 2016). На основе фукоидана сконструированы микро- и макропористые трехмерные каркасные структуры, заполняемые фактором роста сосудистого эндотелия. Эти каркасы позволяют получить более плотные новые сосуды по сравнению с таковыми при использовании каркасов без фукоидана (Purnama et al., 2015).

### Каррагинаны

Каррагинаны – сульфатированные ПС красных водорослей, известные также как сульфатированные галактаны; они состоят из имитирующих структуру гликозаминогликанов млекопитающих чередующихся длинных цепочек  $\alpha$ -1  $\rightarrow$  3 D-галактозы и  $\beta$ -1  $\rightarrow$  4  $\rightarrow$  3  $\rightarrow$  6 ангидрогалактозы с эфирными сульфатами (Shen, Kuo, 2017; Yegarran et al., 2018; Torres et al., 2019). Использование каррагинанов в технологиях регенеративной медицины определяется широким спектром их биологической (иммуномодулирующей, противоопухолевой, противовирусной, антиоксидантной, антикоагулянтной и т.д.) активности, обусловленной вариабельностью первичной структуры этих соединений (Jaballi et al., 2019; Torres et al., 2019).

Благодаря своим физико-химическим свойствам, каррагинаны могут подвергаться как термическому, так и ионному гелеобразованию, а также сочетаться с другими материалами для образования гидрогелевых систем. Свойства гелей зависят от положения и количества сульфатных эфиров:  $\iota$ -каррагинан образует мягкие гели в присутствии двухвалентных ионов кальция,  $\kappa$ -каррагинан формирует твердые и хрупкие гели в присутствии ионов калия (Shen, Kuo, 2017; Yegarran et al., 2018; Torres et al., 2019; Wurm et al., 2019). При конструировании гидрогелевых композитов для доставки лекарств предложены комбинации каррагинана с желатином (Varghese et al., 2014; Li et al., 2015), с полоксамером 407 (Chenxi et al.,

2014), а также с поли(оксиалкиленамином) (Bakarich et al., 2014); для формирования многослойных тканевых 3D-конструкций – с метакриловым ангидридом (Chimene et al., 2016).

Сообщается о разработке на основе каррагинанов гидрогелевых мембран (пленок) или вафельных форм в качестве ранозаживляющих покрытий и эффективных наполнителей в системах доставки с контролируемым высвобождением противоопухолевых лекарств, белков, генов и клеток (Pora et al., 2011; Boateng et al., 2013; Hezaveh, Muhamad, 2013; Akiyode, Boateng, 2018; Lokhande et al., 2018; Yegarran et al., 2018). Например, известно об использовании биопленок на основе  $\kappa$ -каррагинана и полиэтиленоксида (Polyox<sup>®</sup>, Dow Chemical), в которые при лечении хронических ран для усиления ранозаживляющего эффекта вводили стрептомицин и диклофенак. Такие пленки хорошо поглощали раневой экссудат и индуцировали высокую ингибирующую активность по отношению к патогенным микроорганизмам (Boateng et al., 2013). Разработан  $\kappa$ -каррагинановый гидрогель, который загружается гидроклоридом дибукаина. Показано, что гель способствовал пульсирующему высвобождению лекарственного средства с временным интервалом в 50 мин (Makino et al., 2001). На основе комбинации полоксамера 407 и каррагинана создана новая гидрогелевая система для интраназальной доставки кеторолака трометамин (Chenxi et al., 2014). Предложены новые гидрогелевые системы на основе каррагинана и альгината в качестве средств доставки и поддержания жизнеспособности инкапсулированных в них клеток (Pora et al., 2011); каррагинановый гидрогель рассматривается в качестве каркаса для доставки мультипотентных стромальных клеток (Rode et al., 2018). Сообщается о разработке вафельного покрытия, содержащего комплекс  $\kappa$ -каррагинана и альгината натрия, нагруженный микробными биосурфактантами; оно может применяться для лечения хронических ран (Akiyode, Boateng, 2018).

У гидрогелей на основе каррагинана большие перспективы для использования в тканевой инженерии. Наличие в составе каррагинана сульфатированного остова, имитирующего структуру природных сульфатированных гликозаминогликанов внеклеточного матрикса хряща млекопитающих, представляет интерес для их применения при восстановлении хряща. Показаны хондрогенность, нетоксичность и механические свойства  $\kappa$ -каррагинанового гидрогеля, сходные со свойствами нативного хряща. Полученные из жировой ткани человека стволовые клетки, инкапсулированные в такие системы, оставались жизнеспособными, обеспечивая адекватную поддержку в регенерации хряща (Pora et al., 2015a, 2015b). Сообщается о разработке композитных гидрогелей с пористой архитектурой на основе

хитозана и каррагинана. Эти гидрогели способствовали высокой адгезивности и пролиферативной активности культуры хондроцитов *in vitro*, демонстрируя высокий потенциал в восстановлении хряща (Liang et al., 2018). В ряде работ исследована возможность применения гидрогелей на основе каррагинанов для восстановления костной ткани. Например, сообщается о новых материалах для инженерии костной ткани, полученных путем смешивания полигидроксibuтиратов с  $\kappa$ -каррагинаном. В отличие от чистых полиэфирных волокон, смеси с каррагинаном усиливали потенциал остеогенной дифференцировки культуры клеток SaOS-2 (Human Bone osteosarcoma cell line) (Goonoo et al., 2017). На основе комплекса  $\iota$ -каррагинан/хитозан/желатин, имитирующего внеклеточный матрикс, создан каркас, который обеспечивает превосходную поддержку прикрепления и пролиферации мезенхимальных стволовых клеток, а также неоваскуляризацию в процессе остеогенеза (Li et al., 2015). Авторы характеризуют полученный каркас как идеальный материал для инженерии костной ткани.

Методом 3D-биопечати на основе экструзии возможно точное изготовление каркасов из композита альгинат/каррагинан. Отмечены широкие возможности придания композитам механических свойств, необходимых для изготовления 3D-гидрогелевых каркасов, обеспечивающих жизнеспособность клеточных культур (Kim et al., 2019). Каррагинан успешно использовали и в качестве альтернативного наполнителя для усиления эффективности полимерных пористых трехмерных поли(3-гидроксibuтират-со-3-гидроксивалерат) каркасов (Syamimi et al., 2017).

### Ульваны

Ульваны – водорастворимые сульфатированные гетерополисахариды из клеточных стенок зеленых морских макроводорослей рода *Ulva*. Основа химической структуры ульванов, выделенных из разных видов водорослей, представлена дисахаридными повторяющимися звеньями ксилозы, рамнозы и глюкуроновой кислоты (Lahaye, Robic, 2007; Kopel et al., 2016; Yu et al., 2017; Wang et al., 2020). От структурных особенностей ульванов зависят их физико-химические свойства и биологическая активность. Химическое средство повторяющегося звена ульванов с такими гликозаминогликанами, как гиалуронан и хондроитинсульфат, определяет возможность их применения в фармации. Среди свойств, необходимых для конструирования раневых покрытий на основе ульванов, отмечены антиоксидантная, иммуномодулирующая, антимикробная, антикоагулянтная и другие активности (Kopel et al., 2016; Yu et al., 2017; Tabarsa et al., 2018; Wang et al., 2020).

Структуры на основе ульванов включают гидрогели, мембраны, частицы, нановолокна и трехмерные пористые структуры (Tziveleka et al., 2019). Ульваны участвуют в них как самостоятельно, так и в виде комплексов, полученных в результате сшивания или химической модификации. Эти структуры можно использовать при создании раневых покрытий, систем доставки лекарств и в тканевой инженерии. Важная особенность ульванов – способность образовывать термообратимые гели в присутствии ионов бария и кальция при pH от 7.5 до 8.0 (Toskas et al., 2011; Alves et al., 2012a; Kanno et al., 2012; Yu et al., 2018). Образование эфирных связей на гидроксильных группах в результате химической сшивки с эпоксидным 1,4-бутандиолдиглицидиловым эфиром позволило разработать ульвановые мембраны, стабильные в физиологических условиях (Alves et al., 2012b). Сообщается о получении биоразлагаемых гидрогелей на основе сшивания ульванов с дивинилсульфоном в щелочных условиях (Yoshimura et al., 2016).

Присутствие ульвана в матрицах систем доставки лекарств приносит существенную пользу, что обусловлено его высокой биологической активностью. Например, при включении в ульвановые мембраны дексаметазона в качестве модельного лекарственного средства наблюдалось устойчивое высвобождение лекарства (почти 49% в течение первых 8 ч) с последующим более медленным и продолжительным высвобождением в течение 14 дней (Alves et al., 2012b). Ульван использовали в качестве основы в системах гидрофильных матриц, содержащих гормон мелатонин (Vlachou et al., 2018). Разработанные на основе ульванов путем электроформовки с добавлением поливинилового спирта в присутствии борной кислоты и ионов  $\text{Ca}^{2+}$  нановолокна имели однородную структуру с высокой степенью ориентации (Toskas et al., 2011).

Ульваны находят широкое применение в тканевой инженерии (Lahaye, Robic, 2007; Alves et al., 2012a; Yu et al., 2018; Tziveleka et al., 2019). Путем комплексообразования с хитозаном получены ульвановые гранулы для последующего включения в гидрогели, применяемые в костной инженерии (Alves et al., 2012a, 2013; Barros et al., 2013). Разработана стабильная трехмерная пористая структура, способная к контролируемому поглощению жидкости и обладающая улучшенными механическими свойствами для применения в тканевой инженерии (Alves et al., 2013). Ульван использовали для разработки рецептуры костного цемента путем карбоксиметилирования хитозана и ульвана из *Ulva lactuca* (см.: Barros et al., 2013). Авторы сообщают, что включение карбоксиметилированного ульвана улучшило механические характеристики цемента. Оценена активность остеогенеза в каркасах на основе полиэлек-

тролитных комплексов хитозана и ульвана с использованием щелочной фосфатазы в качестве индуктора минерализации (Dash et al., 2018). Показано, что в полученных каркасах наблюдалась минерализация, что способствовало прикреплению клеток, пролиферации и образованию внеклеточного матрикса. По мнению авторов, такие каркасы открывают путь к разработке биоразлагаемых материалов для тканевой инженерии.

Из представленных в обзоре материалов следует, что ПС из морских водорослей являются перспективными биоматериалами в технологиях регенеративной медицины и тканевой инженерии. Это определяется их уникальной структурой, физико-химическими характеристиками и высокой терапевтической активностью. Особо важны такие свойства ПС, как биологическая перестраиваемость, биосовместимость и биоразлагаемость, отсутствие токсичности и возобновляемость. Немаловажной особенностью этих биополимеров является способность образовывать гидрогели в водных растворах самостоятельно или в комплексе с другими соединениями.

ПС водорослей проявляют высокую ранозаживляющую эффективность, обусловленную их антиоксидантными, иммуномодулирующими, антивирусными/антибактериальными, противовоспалительными и антикоагулянтными свойствами. Благодаря этим свойствам на основе ПС водорослей разработаны раневые покрытия разных форм и типов, учитывающие комплексный подход к лечению ран и широко применяемые в клинической практике. Заживление ран – многофазный процесс с участием разных факторов и клеточных медиаторов. Использование обычных (стандартных) раневых покрытий, даже содержащих лекарственный препарат, часто не обеспечивает эффективное заживление глубоких и хронических ран. Кроме этого, при повреждении твердых тканей требуется фиксация или применение костных наполнителей. Биосовместимые и биоразлагаемые природные биополимеры из морских гидробионтов, используемые как перспективные материалы для разработки инновационных видов раневых покрытий, а также комплексный подход с учетом типа и особенностей раны, фазы раневого процесса и других факторов способны обеспечить эффективное и полное её заживление в более короткие сроки.

Биоматериалы на основе ПС применяются при разработке систем доставки лекарственных препаратов, факторов роста, биологически активных веществ и имплантируемых материалов. Широкий спектр биологической активности водорослевых ПС, биосовместимость и биоразлагаемость, способность к гелеобразованию, гидрофильность и естественная жесткость позволяют говорить о них как об идеальных кандидатах для

получения биоматериалов для 3D-биопечати тканей и органов. Преимуществами ПС для использования в 3D-биопечати и других приложениях для тканевой инженерии являются сходство их структуры с человеческим межклеточным матриксом и свойственная им биологическая активность. На основе ПС разработаны структуры в виде гидрогелей, трехмерных пористых структур и нановолокон, спектр применения которых может варьировать от доставки лекарств до целей тканевой инженерии.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Akiyode O., Boateng J.* Composite biopolymer-based wafer dressings loaded with microbial biosurfactants for potential application in chronic wounds // *Polymers*. 2018. V. 10. № 8. Art. 918.
- Alves A., Duarte R.C., Mano J.F. et al.* PDLLA enriched with ulvan particles as a novel 3D porous scaffold targeted for bone engineering // *J. Supercrit. Fluids*. 2012a. V. 65. P. 32–38.
- Alves A., Pinho E.D., Neves N.M. et al.* Processing ulvan into 2D structures: cross-linked ulvan membranes as new biomaterials for drug delivery applications // *Int. J. Pharm.* 2012b. V. 426. P. 76–81.
- Alves A., Sousa R.A., Reis R.L.* Processing of degradable ulvan 3D porous structures for biomedical applications // *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 2013. V. 101. P. 998–1006.
- Andreu V., Mendoza G., Arrueb M., Irusta S.* Smart dressings based on nanostructured fibers containing natural origin antimicrobial, anti-inflammatory, and regenerative compounds // *Materials (Basel)*. 2015. V. 8. P. 5154–5193.
- Annabi N., Rana D., Shirzaei S.E. et al.* Engineering a sprayable and elastic hydrogel adhesive with antimicrobial properties for wound healing // *Biomaterials*. 2017. V. 139. P. 229–243.
- Axpe E., Oyen M.L.* Applications of alginate-based bioinks in 3D bioprinting // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. 1976. <https://doi.org/10.3390/ijms17121976>
- Bakarich S.E., Balding P., Gorkin R. et al.* Printed ionic-covalent entanglement hydrogels from carrageenan and an epoxy amine // *RSC Adv.* 2014. V. 4. № 72. P. 38088–38092.
- Barros A.A.A., Alves A., Nunes C. et al.* Carboxymethylation of ulvan and chitosan and their use as polymeric components of bone cements // *Acta Biomater.* 2013. V. 9. P. 9086–9097.

- Bilal M., Iqbal H.M.N.* Marine seaweed polysaccharides-based engineered cues for the modern biomedical sector // *Mar. Drugs*. 2020. V. 18. № 1. E. 7.
- Boateng J., Burgos-Amador R., Okeke O., Pawar H.* Composite alginate and gelatin based bio-polymeric wafers containing silver sulfadiazine for wound healing // *Int. J. Biol. Macromol.* 2015. V. 79. P. 63–71.
- Boateng J., Catanzano O.* Advanced therapeutic dressings for effective wound healing – a review // *J. Pharm. Sci.* 2015. V. 104. P. 3653–3680.
- Boateng J.S., Pawar H.V., Tetteh J.* Polyox and carrageenan based composite film dressing containing anti-microbial and anti-inflammatory drugs for effective wound healing // *Int. J. Pharm.* 2013. V. 441. P. 181–191.
- Cardoso M.J., Costa R.R., Mano J.F.* Marine origin polysaccharides in drug delivery systems // *Mar. Drugs*. 2016. V. 14. Art. 34.
- Chenxi Li, Chunyan Li, Zheshuo Liu et al.* Enhancement in bioavailability of ketorolac tromethamine via intranasal *in situ* hydrogel based on poloxamer 407 and carrageenan // *Int. J. Pharm.* 2014. V. 474. P. 123–133.
- Chimene D., Lennox K.K., Kaunas R.R., Gaharwar A.K.* Advanced bioinks for 3D printing: a materials science perspective // *Ann. Biomed. Eng.* 2016. V. 44. P. 2090–2102.
- Ching S.H., Bansal N., Bhandari B.* Alginate gel particles – a review of production techniques and physical properties // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2017. V. 57. P. 1133–1152.
- Citkowska A., Szekalska M., Winnicka K.* Possibilities of fucoidan utilization in the development of pharmaceutical dosage forms // *Mar. Drugs*. 2019. V. 17. № 8. Art. 458.
- Cunha L., Grenha A.* Sulfated seaweed polysaccharides as multifunctional materials in drug delivery applications // *Mar. Drugs*. 2016. V. 14. № 3. Art. 42.
- Dash M., Samal S.K., Morelli A. et al.* Ulvan-chitosan polyelectrolyte complexes as matrices for enzyme induced biomimetic mineralization // *Carbohydr. Polym.* 2018. V. 182. P. 254–264.
- Dhivya S., Padma V.V., Santhini E.* Wound dressings – a review // *BioMedicine (Taipei)*. 2015. V. 5. P. 24–28.
- Feki A., Bardaa S., Hajji S. et al.* *Falkenbergia rufolanosa* polysaccharide – Poly(vinyl alcohol) composite films: a promising wound healing agent against dermal laser burns in rats // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 144. P. 954–966.
- Gaharwar A.K., Peppas N.A., Khademhosseini A.* Nanocomposite hydrogels for biomedical applications // *Bio-technol. Bioeng.* 2014. V. 111. № 3. P. 441–453.
- Goonoo N., Khanbabaee B., Steuber M. et al.*  $\kappa$ -Carrageenan enhances the biomineralization and osteogenic differentiation of electrospun polyhydroxybutyrate and polyhydroxybutyrate valerate fibers // *Biomacromolecules*. 2017. V. 18. № 5. P. 1563–1573.
- Gowda D.V., Fredric S., Srivastava A. et al.* Design and development of antimicrobial wafers for chronic wound healing // *Pharm. Lett.* 2016. V. 8. P. 70–79.
- Hajiali H., Summa M., Russo D. et al.* Alginate–lavender nanofibers with antibacterial and anti-inflammatory activity to effectively promote burn healing // *J. Mater. Chem. B*. 2016. V. 4. P. 1686–1695.
- Hezaveh H., Muhamad I.I.* Modification and swelling kinetic study of kappa-carrageenan-based hydrogel for controlled release study // *J. Taiwan. Inst. Chem. Eng.* 2013. V. 44. P. 182–191.
- Hu C., Gong R.H., Zhou F.L.* Electrospun sodium alginate/polyethylene oxide fibers and nanocoated yarns // *Int. J. Polym. Sci.* 2015. V. 2015. P. 1–12.
- Jaballi I., Sallem I., Feki A. et al.* Polysaccharide from a Tunisian red seaweed *Chondrus canaliculatus*: structural characteristics, antioxidant activity and *in vivo* hemato-nephroprotective properties on maneb induced toxicity // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. V. 123. P. 1267–1277.
- Jovic T.H., Kungwengwe G., Mills A.C., Whitaker I.S.* Plant-derived biomaterials: a Review of 3D bioprinting and biomedical applications // *Front. Mech. Eng.* 2019. V. 5. P. 19.  
<https://doi.org/10.3389/fmech.2019.00019>
- Kanno K., Akiyoshi K., Nakatsuka T. et al.* Biocompatible hydrogel from a green tide-forming chlorophyta // *J. Sustain. Dev.* 2012. V. 5. P. 38–45.
- Kim M.H., Lee Y.W., Jung W.-K. et al.* Enhanced rheological behaviors of alginate hydrogels with carrageenan for extrusion-based bioprinting // *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2019. V. 98. P. 187–194.
- Kopel M., Helbert W., Belnik Y. et al.* New family of ulvan lyases identified in three isolates from the Alteromonadales order // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. № 11. P. 5871–5878.
- Lahaye M., Robic A.* Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds // *Bio-macromolecules*. 2007. V. 8. № 6. P. 1765–1774.
- Li J., Yang B., Qian Y. et al.* Iota-carrageenan/chitosan/gelatin scaffold for the osteogenic differentiation of adipose-derived MSCs *in vitro* // *J. Biomed. Mater. Res. Part B*. 2015. V. 103. № 7. P. 1498–1510.
- Liang X., Wang X., Xu Q. et al.* Rubbery chitosan/carrageenan hydrogels constructed through an electroneutrality system and their potential application as cartilage scaffolds // *Biomacromolecules*. 2018. V. 19. № 2. P. 340–352.
- Lokhande G., Carrow J.K., Thakur T. et al.* Nanoengineered injectable hydrogels for wound healing application // *Acta Biomater.* 2018. V. 70. P. 35–47.
- Lowe B., Venkatesan J., Anil S. et al.* Preparation and characterization of chitosan-natural nano hydroxyapatite-fucoidan nanocomposites for bone tissue engineering // *Int. J. Biol. Macromol.* 2016. V. 93. P. 1479–1487.
- Makino K., Idenuma R., Murakami T., Ohshima H.* Design of a rate- and time-programming drug release device using a hydrogel: pulsatile drug release from  $\kappa$ -carrageenan hydrogel device by surface erosion of the hydrogel // *Colloids Surf. B*. 2001. V. 20. P. 355–359.
- Matthews K.H., Stevens H.N., Auffret A.D. et al.* Lyophilised wafers as a drug delivery system for wound healing containing methylcellulose as a viscosity modifier // *Int. J. Pharm.* 2005. V. 289. P. 51–62.
- Mayet N., Choonara Y.E., Kumar P. et al.* A comprehensive review of advanced biopolymeric wound healing systems // *J. Pharm. Sci.* 2014. V. 103. P. 2211–2230.
- Menshova R.V., Shevchenko N.M., Imbs T.I. et al.* Fucoidans from brown alga *Fucus evanescens*: structure and biological activity // *Front. Mar. Sci.* 2016. V. 3. Art. 129.

- Mishra S., Sharma S., Javed M.N. et al. Bioinspired nanocomposites: applications in disease diagnosis and treatment // *Pharm. Nanotechnol.* 2019. V. 7. № 3. P. 206–219.
- Murakami K., Aoki H., Nakamura S. et al. Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings // *Biomaterials.* 2010. V. 31. № 1. P. 83–90.
- Nakamura S., Nambu M., Ishizuka T. et al. Effect of controlled release of fibroblast growth factor-2 from chitosan/fucoidan micro complex-hydrogel on *in vitro* and *in vivo* vascularization // *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 2008. V. 85. P. 619–627.
- Park J.-H., Choi S.-H., Park S.-J. et al. Promoting wound healing using low molecular weight fucoidan in a full-thickness dermal excision rat model // *Mar. Drugs.* 2017. V. 15. Art. 112.
- Pawar H.V., Boateng J.S., Ayensu I., Tetteh J. Multifunctional medicated lyophilised wafer dressing for effective chronic wound healing // *J. Pharm. Sci.* 2014. V. 103. P. 1720–1733.
- Popa E.G., Reis R.L., Gomes M.E. Seaweed polysaccharide-based hydrogels used for the regeneration of articular cartilage // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2015a. V. 35. № 3. P. 410–424.
- Popa E.G., Caridade S.G., Man J.F. et al. Chondrogenic potential of injectable  $\kappa$ -carrageenan hydrogel with encapsulated adipose stem cells for cartilage tissue-engineering applications // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2015b. V. 9. P. 550–563.
- Popa E.G., Gomes M.E., Reis R.L. Cell delivery systems using alginate–carrageenan hydrogel beads and fibers for regenerative medicine applications // *Biomacromolecules.* 2011. V. 12. P. 3952–3961.
- Pozharitskaya O.N., Shikov A.N., Obluchinskaya E.D., Vuorela H. The pharmacokinetics of fucoidan after topical application to rats // *Mar. Drugs.* 2019. V. 17. Art. 687.
- Purnama A., Aid-Launais R., Haddad O. et al. Fucoidan in a 3D scaffold interacts with vascular endothelial growth factor and promotes neovascularization in mice // *Drug Delivery Transl. Res.* 2015. V. 5. P. 187–197.
- Rode M.P., Angulski A.B.B., Gomes F.A. et al. Carrageenan hydrogel as a scaffold for skin-derived multipotent stromal cells delivery // *J. Biomater. Appl.* 2018. V. 33. № 3. P. 422–434.
- Rupérez P., Gómez-Ordóñez E., Jiménez-Escrig A. Biological activity of algal sulfated and nonsulfated polysaccharides // *Bioact. Compd. Mar. Foods Plant Anim. Sources.* 2013. V. 11. P. 219–247.
- Saarai A., Sedlacek T., Kasparkova V. et al. On the characterization of sodium alginate/gelatine-based hydrogels for wound dressing // *J. Appl. Polym. Sci.* 2012. V. 126. P. E79–E88.
- Sezer A.D., Cevher E., Hatipoğlu F. et al. Preparation of fucoidan-chitosan hydrogel and its application as burn healing accelerator on rabbits // *Biol. Pharm. Bull.* 2008. V. 31. P. 2326–2333.
- Shafei S., Khanmohammadi M., Heidari R. et al. Exosome loaded alginate hydrogel promotes tissue regeneration in full-thickness skin wounds: An *in vivo* study // *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 2019. V. 108. № 3. P. 545–556.
- Shen Y.-R., Kuo M.-I. Effects of different carrageenan types on the rheological and water-holding properties of tofu // *LWT-Food Sci. Technol.* 2017. V. 78. P. 122–128.
- Slima S.B., Trabelsi I., Ktari N. et al. Novel *Sorghum bicolor* (L.) seed polysaccharide structure, hemolytic and antioxidant activities, and laser burn wound healing effect // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. V. 132. P. 87–96.
- Solovieva E.V., Fedotov A.Y., Mamonov V.E. et al. Fibrinogen-modified sodium alginate as a scaffold material for skin tissue engineering // *Biomed. Mater.* 2018. V. 13. P. 2. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aa9089>
- Stöblein S., Grunwald I., Stelten J., Hartwig A. In-situ determination of time-dependent alginate-hydrogel formation by mechanical texture analysis // *Carbohydr. Polym.* 2019. V. 205. P. 287–294.
- Straccia M.C., d'Ayala G.G., Romano I. et al. Alginate hydrogels coated with chitosan for wound dressing // *Mar. Drugs.* 2015. V. 13. P. 2890–2908.
- Sudarsan S., Franklin D.S., Guhanathan S. Imbibed salts and pH-responsive behaviours of sodium-alginate based eco-friendly biopolymeric hydrogels – a solvent-less approach // *MMAIJ.* 2015. V. 11. P. 24–29.
- Sun J., Tan H. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications // *Materials (Basel).* 2013. V. 6. P. 1285–1309.
- Syamimi N., Che Johari N.S., Aizad S., Zubairi S.I. Efficacy study of carrageenan as an alternative infused material (filler) in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) porous 3D scaffold // *Int. J. Polym. Sci.* 2017. V. 2017. P. 1–12. <https://doi.org/10.1155/2017/5029194>
- Tabarsa M., You S.-G., Dabaghian E.H., Surayot U. Water-soluble polysaccharides from *Ulva intestinalis*: molecular properties, structural elucidation and immunomodulatory activities // *J. Food Drug Anal.* 2018. V. 26. P. 599–608.
- Thomas S. Alginate dressings in surgery and wound management – part 1 // *J. Wound Care.* 2000. V. 9. № 2. P. 56–60.
- Torres M.D., Flórez-Fernández N., Domínguez H. Integral utilization of red seaweed for bioactive production // *Mar. Drugs.* 2019. V. 17. Art. 314.
- Toskas G., Hund R.-D., Laourine E. et al. Nanofibers based on polysaccharides from the green seaweed *Ulva rigida* // *Carbohydr. Polym.* 2011. V. 84. P. 1093–1102.
- Tziveleka L.A., Ioannou E., Roussis V. Ulvan, a bioactive marine sulphated polysaccharide as a key constituent of hybrid biomaterials: a review // *Carbohydr. Polym.* 2019. V. 218. P. 355–370.
- Varghese J.S., Chellappa N., Fathima N.N. Gelatin-carrageenan hydrogels: role of pore size distribution on drug delivery process // *Colloids Surf. B.* 2014. V. 113. P. 346–351.
- Venkatesan J., Bhatnagar I., Manivasagan P. et al. Alginate composites for bone tissue engineering: a review // *Int. J. Biol. Macromol.* 2015. V. 72. P. 269–281.
- Venkatesan J., Anil S., Kim S.-K., Shim M.S. Seaweed polysaccharide-based nanoparticles: preparation and applications for drug delivery // *Polymers.* 2016. V. 8. P. 30–54.

- Vlachou M., Tragou K., Siamidi A. et al. Modified *in vitro* release of the chronobiotic hormone melatonin from matrix tablets based on the marine sulfated polysaccharide ulvan // J. Drug Deliv. Sci. Technol. 2018. V. 44. P. 41–48.
- Wang L., Lee W.W., Oh J.Y. et al. Protective effect of sulfated polysaccharides from Celluclast-assisted extract of *Hizikia fusiforme* against ultraviolet B-induced skin damage by regulating NF- $\kappa$ B, AP-1, and MAPKs signaling pathways *in vitro* in human dermal fibroblasts // Mar. Drugs. 2018. V. 16. Art. 239.
- Wang S., Wang W., Hou L. et al. A sulfated glucuronorhamnan from the green seaweed *Monostroma nitidum*: characteristics of its structure and antiviral activity // Carbohydr. Polym. 2020. V. 227. P. 115280.
- Wurm F., Pham T., Bechtold T. Modelling of phase separation of alginate-carrageenan gels based on rheology // Food Hydrocolloids. 2019. V. 89. P. 765–772.
- Xing L., Sun J., Tan H. et al. Covalently polysaccharide-based alginate/chitosan hydrogel embedded alginate microspheres for BSA encapsulation and soft tissue engineering // Int. J. Biol. Macromol. 2019. V. 127. P. 340–348.
- Yanagibayashi S., Kishimoto S., Ishihara M. et al. Novel hydrocolloid-sheet as wound dressing to stimulate healing-impaired wound healing in diabetic db/db mice // Biomed. Mater. Eng. 2012. V. 22. P. 301–310.
- Yegappan R., Selvaprithiviraj V., Amirthalingam S., Jayakumar R. Carrageenan based hydrogels for drug delivery, tissue engineering and wound healing // Carbohydr. Polym. 2018. V. 198. P. 385–400.
- Yoshimura T., Hirao N., Fujioka R. Preparation and characterization of biodegradable hydrogels based on ulvan, a polysaccharide from green seaweeds // Polym. Renewable Resour. 2016. V. 7. P. 33–42.
- Yu C.C., Chang J.J., Lee Y.H. et al. Electrospun scaffolds composing of alginate, chitosan, collagen and hydroxyapatite for applying in bone tissue engineering // Mater. Lett. 2013. V. 93. P. 133–136.
- Yu Y., Li Y., Du C. et al. Compositional and structural characteristics of sulfated polysaccharide from *Enteromorpha prolifera* // Carbohydr. Polym. 2017. V. 165. P. 221–228.
- Yu Y., Shen M., Song Q., Xie J. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: a review // Carbohydr. Polym. 2018. V. 183. P. 91–101.

## Polysaccharides from Marine Algae in Modern Technologies of Regenerative Medicine

T. A. Kuznetsova<sup>a</sup>, B. G. Andryukov<sup>a</sup>, N. N. Besednova<sup>a</sup>, and Y. S. Khotimchenko<sup>b, c</sup>

<sup>a</sup>Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok 690087, Russia

<sup>b</sup>Far Eastern Federal University, School of Biomedicine, Vladivostok 690091, Russia

<sup>c</sup>A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

The present review considers the physicochemical and biological properties of polysaccharides (PS) obtained from marine algae (alginates and fucoidans from brown algae; carrageenans from red algae; and ulvans from green algae). These PS are used in the latest technologies of regenerative medicine (tissue engineering, modulation of drug delivery system, and design of wound dressing materials). A special attention is paid to the ability of PS to form hydrogels, as hydrogel dressings meet the basic requirements for a perfect wound dressing. The review discusses the current trends in the development of a new generation of PS-based materials for creation of drug delivery systems and various tissue-engineering scaffolds; this approach allows to create human-specific tissues and to develop target-oriented and personalized regenerative medicine products.

**Keywords:** algae polysaccharides, alginates, fucoidans, carrageenans, ulvans, hydrogel, wound dressings, tissue regeneration



УДК 578.4(262.5):681.3.06:535.8

## МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ И ЭКСПЕРИМЕНТЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ЧЕРНОМОРСКИХ АЛЬГОВИРУСОВ

© 2021 г. О. А. Степанова<sup>1</sup>, \*, П. В. Гайский<sup>1</sup>, С. А. Шоларь<sup>2</sup>, \*\*

<sup>1</sup>Институт природно-технических систем РАН, Севастополь 299011, Россия

<sup>2</sup>Морской гидрофизический институт РАН, Севастополь 299011, Россия

\*e-mail: solar-ua@ya.ru,

\*\*e-mail: sa.sholar@mail.ru

Поступила в редакцию 06.09.2019 г.

После доработки 24.01.2020 г.

Принята к публикации 30.01.2020 г.

В России основные исследования альговирuсов Чёрного моря проводятся на базе научных институтов, находящихся в г. Севастополь. Анализ методологических подходов, использованных в 2002–2019 гг., показал, что в ходе поиска, изоляции и изучения альговирuсов применимы как классические вирусологические методики, так и методы, разработанные и запатентованные недавно, в том числе авторами обзора. Исследование проб клинического материала и материала от гидробионтов, а также проведение модельных экспериментов, в том числе с использованием уникальной лабораторной установки и экспериментального стенда, позволили получить новые данные о биологии и экологии морских вирусoв. На основании результатов этих исследований предложено использовать мониторинг альговирuсов как составляющую экомониторинга изучаемых акваторий, рассматривая альговирuсы в качестве биологических индикаторов и/или маркёров.

*Ключевые слова:* альговирuсы, микроводоросли, вирусный лизис, Чёрное море, лабораторная установка, экспериментальный стенд

**DOI:** 10.31857/S0134347521010095

С относительно недавнего времени вирусy гидросферы представляют особый интерес для ученых, оценивающих их как важнейших игроков в глобальной экологии и как одну из главных движущих сил биогеохимических циклов (Wommack, Colwell, 2000; Proposal for..., 2005; Suttle, 2007; Middelboe, Brussaard, 2017; Viruses of Microorganisms..., 2018). И хотя значимость морских (водных) вирусoв очевидна, на многие вопросы пока нет ответа, поскольку не все процессы в вирусной экологии изучены (Лихошвай, 2016; Степанова, 2018a; Viruses of Microorganisms..., 2018).

Материалы и методы, используемые зарубежными коллегами в морской (водной) вирусологии, подробно изложены в руководстве по экологии водных вирусoв (Manual of..., 2010). В этой работе наряду с классическими общепринятыми методиками поиска и изучения вирусoв гидросферы приведены сложные методы (например, генетический анализ), которые требуют применения дорогостоящей аппаратуры и материалов. Использование тех или иных методов зависит от поставленных целей и задач, которые, в свою очередь, ограничены условиями лабораторных экспериментов и уровнем оснащённости научных подразделений.

Исследования в области морской вирусологии активно ведутся в США, Канаде, Японии и странах западной Европы. Сообщество морских (водных) вирусологов регулярно проводит международные семинары, конференции, встречи по обмену информацией и опытом, а также публикует общие материалы (Proposal for..., 2005; Manual of..., 2010; Viruses of Microorganisms..., 2018). По результатам изучения морских (водных) вирусoв опубликован ряд обзоров (Wommack, Colwell, 2000; Степанова, 2004; Stepanova, 2005; Middelboe, Brussaard, 2017, и др.).

В России исследования по водной вирусологии проводятся в Лимнологическом институте СО РАН (г. Иркутск), в Институте биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина (пос. Борок) и в Институте природно-технических систем (ИПТС) (г. Севастополь). В Лимнологическом институте с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) изучены сезонная динамика, морфологическое разнообразие и распределение бактериофагов в озерах Байкал (Россия) и Хубсугул (Монголия) (см.: Дрюккер и др., 2006, 2008, 2011; Дрюккер, Дутова, 2006, 2009; Дутова, Дрюккер, 2009, 2013). В Институте биологии внутренних вод выполнены электронно-микроскопические исследования проб воды для описа-

ния морфологии, определения численности и изучения роли водных вирусов (бактериофагов) в структуре и функционировании микробных сообществ пресноводных экосистем (Копылов и др., 2007, 2008, 2010, 2011; Копылов, 2013).

Открытие альговирюсов, заражающих эукариотические водоросли, обусловило появление новых вопросов. Например, как эти вирусы влияют на первичную продукцию водных организмов, какова их роль в экологии и эволюции водорослей и т.д. В настоящее время описано 65 сохраняемых в коллекциях вирусов эукариотических водорослей (Coy et al., 2018; Viruses of Microorganisms..., 2018). На основе экспериментальных данных исследован процесс вирусного лизиса с использованием микробиоты тихоокеанских регионов (альговирюсы и микроводоросли) с экстраполяцией некоторых полученных результатов на гидросферу (Balch et al., 2002; Simis et al., 2005, 2007; Uitz et al., 2010). Обнаруженные в условиях эксперимента характерные изменения, возникающие в ходе вирусного лизиса, предложено использовать для индикации этого процесса и для выявления массовой смертности одноклеточных хозяев в водоемах с помощью оптического дистанционного зондирования. До настоящего времени роль вирусов и вирусного лизиса в изменении физических характеристик их водной среды обитания не рассматривали, они также не учитывались в качестве активных компонентов физики и оптики моря и гидросферы в целом (Степанова, 2018а). Этот аспект морской вирусологии остается недостаточно изученным в теории и практике физики и оптики моря.

Морская вирусология как новое научное направление развивалась с 1994 г. на базе Института биологии южных морей (ИнБЮМ), в дальнейшем исследования были продолжены в ИПТС (Степанова, 2001, 2004, 2005, 2007, 2016, 2017а, 2017б, 2018б, 2018в; Степанова и др., 2005, 2009, 2013, 2018; Stepanova, 2005, 2014; Степанова, Стельмах, 2017).

С 2000-х гг. основные исследования нацелены на поиск, изоляцию и изучение альговирюсов, интерес к которым связан со значимостью их хозяев — представителей фитопланктона. С помощью методов, запатентованных авторами настоящего обзора (Декларационный патент..., 2004; Патент..., 2012), за период 2002–2019 гг. исследовано более тысячи проб, из которых выделено свыше 300 штаммов альговирюсов семи видов микроводорослей и изолированы штаммы цианофага одного вида цианобактерий. В 2007 г. предложенный авторами метод апробирован на базе Бергенского университета для выделения альговирюсов из полевого материала (морская вода и моллюски), отобранного в Норвежском море (Pagarete et al., 2015). Получены электронно-микроскопические изображения (фото) альговирюсов пяти видов черноморских микроводорослей (Степанова, 2004, 2016; Степанова и др., 2005, 2009; Шоларь,

Степанова, 2010, 2019). В соответствии с международной программой по проекту “Marine Phage, Virus & Virome Sequencing Project” (Broad Institute, MIT, USA) три вирусных штамма изучены на генетическом уровне; информация представлена в базах данных CAMERA (Community Cyberinfrastructure for Advanced Marine Microbial Research and Analysis) и NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Степанова и др., 2013; Stepanova, 2014). В результате модельных экспериментов получены новые сведения о роли вирусного лизиса в изменении электрической проводимости (ЭП) морской воды, показана необходимость учета морских вирусов и вирусного лизиса в физике и оптике моря (Степанова, Гайский 2018; Степанова и др., 2018; Шоларь, Степанова, 2019).

Таким образом, несмотря на очевидную актуальность научного направления морской (водной) вирусологии в области исследования альговирюсов, в России в период 2002–2019 гг. основной опыт по поиску, изоляции и изучению вирусов микроводорослей с определением их роли и значения в экологии Черного моря был получен и накоплен в научных учреждениях г. Севастополь. Исходя из этого и учитывая возможность самостоятельного освоения методологических подходов, использованных в ходе этих исследований, мы приводим краткий обзор и общую характеристику методов поиска морских вирусов в пробах полевого материала, а также изоляции и изучения альговирюсов Чёрного моря, рассчитывая на повышение интереса ученых к проблемам морской вирусологии.

#### *Исследованный материал и подготовка проб для изоляции альговирюсов*

Изоляцию альговирюсов проводили по запатентованным авторским методикам (Декларационный патент..., 2004; Патент..., 2012) из проб морской воды и донных отложений (грунтов), из мантийной жидкости мидии *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 (Bivalvia: Mytilidae) и из суспензии жабр рыб разных видов.

Пробы отбирали в закрытых и открытых бухтах южного и юго-западного Крыма, в том числе в бухтах в районе Севастополя. В 2019 г. на наличие альговирюсов исследовали донные отложения, отобранные по всему периметру побережья п-ва Крым, в том числе в Азовском море, а также у прилегающего черноморского побережья у городов Анапа, Туапсе, Сочи и Геленджик.

В 2008 г. альговирюсы были изолированы в ходе исследования клинического материала, полученного от людей, заболевших после пребывания на черноморских курортах (Stepanova et al., 2011; Stepanova, 2014). Таким образом, была подтверждена выдвинутая авторами гипотеза о циркуляции вирусов между сушей и гидросферой. В результате циркуляции происходит освоение новой

экологической ниши и появляются “новые” вирусы, патогенные для флоры и фауны нашей планеты. Например, известны данные, свидетельствующие о роли вирусов гидросферы в патологии психики млекопитающих (Yolken et al., 2014).

Для изоляции альговирусов обычно используют полевой материал, в основном пробы морской воды, поэтому более подробно мы остановимся на особенностях отбора и подготовки проб.

Пробы морской воды отбирали у кромки берега на небольшой глубине (10–30 см от поверхности) при помощи стеклянной емкости (банки) объемом 200–300 мл, в ряде случаев – ведром с борта экспедиционного судна. Воду в бутылках объемом 200–300 мл доставляли в лабораторию. Для заражения соответствующих культур микроводорослей использовали по 2.0 мл пробы воды без предварительной обработки. Для увеличения возможности изоляции альговирусов микроводорослей некоторых видов, обладающих физиологическими особенностями, пробу воды использовали повторно, сохраняя ее на рассеянном свете при комнатной температуре в течение 7–20 сут (Патент..., 2012).

Мантийную жидкость у особей *M. galloprovincialis* отбирали, приоткрыв створки моллюска. В одной пробе объединяли материал от нескольких моллюсков из одного местообитания. Мантийную жидкость в объеме около 2.0 мл отстаивали в течение  $\leq 1$  ч или центрифугировали. Из-за высокой концентрации вирусов в этих пробах для изоляции альговирусов использовали 0.5–1.0 мл надосадочной жидкости (Степанова, 2004, 2017а).

Из жабр рыб готовили 10–30% суспензию на морской стерильной воде или среде Гольдберга, которую также отстаивали в течение  $\leq 1$  ч или центрифугировали (Степанова, 2004, 2007; Степанова, Кузьминова, 2006). Для исследований использовали 0.2 мл надосадка приготовленной суспензии.

Известно, что численность вирусов в донных отложениях на порядки выше, чем в микропланктоне (Степанова, 2001, 2004). Из проб донных отложений (грунта) готовили 10% болтушку на морской стерильной воде или среде Гольдберга, затем надосадочную жидкость отстаивали в течение  $\leq 1$  ч или центрифугировали; для исследований использовали 1.0 мл надосадочной жидкости.

#### Метод изоляции черноморских альговирусов

В основе методик выделения альговирусов из проб полевого материала лежит известное свойство вирусов вызывать лизис у их одноклеточных хозяев (бактерий, микроводорослей). Вирусный лизис приводит к повышению прозрачности и изменению цвета жидкой среды, в которой происходит контакт вирусов и их хозяев. Это свойство, проявление которого можно наблюдать визуально и с помощью специальных оптических приборов, авторы использовали при создании простых

и доступных методов изоляции альговирусов черноморских микроводорослей (Декларационный патент..., 2004; Патент..., 2012).

Для изоляции альговирусов в бактериологические лабораторные пробирки пипеткой вносили 2.0 мл исследуемой пробы морской воды (0.2, 0.5–1.0 или 1.0 мл проб, приготовленных из жабр рыб, мантийной жидкости мидий или донных отложений соответственно) и добавляли 2.0 мл жидкой культуры микроводоросли в логарифмической стадии роста в стабилизирующей среде Гольдберга. В контроле 2.0 мл культуры микроводоросли вносили в 2.0 мл пастеризованной или стерильной морской воды или в такой же объем стабилизирующей среды Гольдберга.

В исследованиях использовали жидкие культуры микроводорослей *Tetraselmis viridis* (Rouchijajnen) R.E. Norris, Hori & Chihara, 1980; *Dunaliella viridis* Teodoresco, 1905; *Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin, 1897; *Prorocentrum pusillum* (Schiller) Dodge & Bibby, 1973; *Isochrysis galbana* Parke, 1949; *Emiliania huxleyi* (Lohmann) Hay & Mohler, 1967; *Stichococcus bacillaris* Nägeli, 1849; *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco, 1905 и *Chlorella vulgaris* Beyerinck [Beijerinck], 1890, полученные из отдела экологической физиологии водорослей ИнБЮМ. Этот же отдел института предоставил жидкую культуру цианобактерий *Synechococcus* sp. (BS 9001 4/М). В 2016 г. для изоляции черноморских альговирусов впервые использовали альгологическую чистую культуру *Tisochrysis lutea* (Haptophyta) клон MBRU\_Tiso-08 из коллекции “Морской биобанк” Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (<http://marbank.dvo.ru>) (Степанова, Стельмах, 2017).

После заражения жидких культур микроводорослей в малых объемах (в бактериологических пробирках) наблюдения осуществляли в течение 20 сут. Известно, что, если в пробе присутствует искомым альговирус, изменения проявляются уже через 5–10 сут: интенсивность окраски культуры снижается до полного исчезновения цвета, а прозрачность повышается (Степанова, 2014). Затем выполняли несколько пассажей для установления стойкого инкубационного периода и накопления вирусной суспензии (в пробирках). Для получения большого объема вирусных суспензий (0.5–1.0 л) инфицирование жидких культур микроводорослей проводят в пропорции приблизительно 1 : 10, например, 30–50 мл вирусной суспензии на 0.3–0.5 л культуры. При этом лизис наступает на несколько дней позже, чем при использовании пробирок.

В 2002–2019 гг. из проб полевого и клинического материала изолированы новые для науки альговирусы морских микроводорослей *T. viridis* (TvV), *D. viridis* (DvV), *P. tricornerutum* (PtV), *P. pusillum* (PpV), *I. galbana* (IgV) и *T. lutea* (TlV), а также новые для экосистемы Чёрного моря штаммы альговируса микроводоросли *E. huxleyi* (EhV) и

цианофага к культуре цианобактерии *Synechococcus* sp. (ScV). Всего из 1054 изученных проб полевого и клинического материала выделено 325 штаммов альговирюсов, среди которых 80 – TvV, 136 – PtV, 41 – DvV, 20 – PpV, 21 – IgV, 18 – EhV, 3 – ScV и 6 – TIV. Каждая из клинических проб объединяла биологический материал от 2–5 человек; всего материал был взят у 182 пациентов, обработана 41 проба. Из клинических проб выделены 16 вариантов PtV (Stepanova et al., 2011).

Следует отметить, что наиболее успешным (“выгодным”) объектом для изоляции альговирюсов стали мидии, поскольку около 50% всех изученных проб из мантийной жидкости этих моллюсков были контаминированы альговирюсами (Stepanova, 2004, 2016, 2017a, 2018б). Однако мидии как организмы-фильтраторы могут сохранять и накапливать вирусы в течение длительного периода времени, что не позволяет использовать их для мониторинга альговирюсов. Результаты мониторинга при каждом отборе проб должны отражать текущую ситуацию в исследуемой акватории гидроэкосистемы, в нашем случае – наличие (циркуляцию) альговирюсов тех или иных микроводорослей или их отсутствие (численность ниже порога чувствительности используемых методов) в период отбора проб. Кроме этого, в зимнее время отбор мидий связан с определенными трудностями.

Наиболее удобным материалом для исследования альговирюсов служат пробы морской воды, так как их отбор не представляет сложности в любой сезон года, они не требуют предварительной обработки и в 13–66% всех изученных проб морской воды (в зависимости от принадлежности вируса к тому или иному виду микроводоросли-хозяина) обнаруживаются альговирюсы (Stepanova, 2018б).

Запатентованный авторами простой доступный и легко воспроизводимый метод изоляции черноморских альговирюсов может быть рекомендован для использования в любых лабораториях, в том числе и слабо оснащенных. Метод является основой для титрования альговирюсов; он позволяет определять концентрацию (инфекционный титр, численность) вирусов в вирусных суспензиях и в изучаемых пробах, например, для установления сезонной численности альговирюсов в микропланктоне морской воды исследуемых акваторий. Этот метод был использован для изучения хозяев черноморских альговирюсов (Stepanova, 2016), для определения вида изолята неизвестной микроводоросли в чистой культуре (Stepanova, Галатонина, 2009), для выявления влияния на титры альговирюсов ДНК и продуктов ее распада, попадающих в окружающую среду в результате вирусного лизиса (Stepanova, 2005), а также в модельных экспериментах при изучении роли вирусного лизиса в изменении физических характеристик среды обитания альговирюсов (Stepanova, Гайский, 2018; Степанова и др., 2018; Шоларь, Степанова, 2019).

Метод использовали также для мониторинга черноморских альговирюсов в экосистеме Крымского региона Чёрного моря. В первую очередь его применяли для изучения распространения, распределения и сезонности альговирюсов, отражающих экологические характеристики микроводорослей-хозяев, а также как часть экомониторинга акваторий в окрестностях г. Севастополь с учетом чувствительности микроводорослей-хозяев альговирюсов к экологической ситуации (Stepanova, 2016, 2018б, 2018в). На основании результатов поиска и изоляции альговирюсов как биологических индикаторов микроводорослей-хозяев предложено применять подобные исследования для изучения географического распространения микроводорослей, а результаты мониторинга альговирюсов в бухтах г. Севастополь подтвердили возможность использования альговирюсов в качестве экологического индикатора (Stepanova, 2007, 2017б, 2018б, 2018в). Анализ результатов изоляции альговирюсов из жабр рыб показал, что вирусная контаминация изучаемого материала наблюдается лишь в холодный сезон года при сокращении продолжительности светового дня. Авторы связывают этот факт со снижением иммунологического статуса организма гидробионтов и рекомендуют использовать тест на наличие альговирюсов в жабрах рыб при изучении состояния популяций представителей ихтиофауны (Stepanova, 2007).

#### *Предварительное изучение черноморских альговирюсов*

Использование простого и доступного авторского метода изоляции альговирюсов из проб морской воды позволило получить представление о сезонности (частоте изоляции альговирюсов в разные сезоны) и определить титр (концентрацию, численность) вирусов в пробе воды и в вирусной суспензии (после установления стойкого инкубационного периода) (Stepanova, 2016). Так, в воде титр альговирюсов микроводорослей *T. viridis* и *D. viridis* при сезонном пике численности их хозяев достигал  $10^5$ – $10^6$  инфекционных единиц в 1 мл, а в вирусных суспензиях был выше на 5–7 порядков. Титры альговирюсов других микроводорослей как в пробах воды, так и в вирусных суспензиях были на несколько порядков ниже. Таким образом, титры альговирюсов в пробах морской воды и в вирусных суспензиях зависят от сезона, сезонного пика и вида хозяина. Очевидна также зависимость титров альговирюсов от экологического статуса изучаемых акваторий, к которому чувствительны микроводоросли – хозяева альговирюсов; частоту изоляции альговирюсов могут определять и неустановленные биотические и абиотические факторы, влияющие как на хозяев, так и на вирусы (Stepanova, 2018a).

В практике вирусологи используют такие простые и доступные классические методики, опи-

санные в пособиях по общей вирусологии, как определение приблизительных размеров изучаемых вирусов на основе фильтрования вирусных суспензий через фильтры с известным размером пор; выявление температурной чувствительности вирусов — определение температуры их инактивации и устойчивости к замораживанию и/или нагреванию. Устойчивость вирусов к температурному фактору косвенно подтверждает их простое строение, а неустойчивость может свидетельствовать о сложном строении вирусов, например, о наличии суперкапсида, который выявляется по чувствительности к хлороформу.

Применение этих простых методик при изучении черноморских альговирусов (Степанова, 2004, 2016; Степанова, Стельмах, 2017) позволило получить данные по биологии и экологии новых для науки альговирусов, а также двух новых для экосистемы Черного моря вирусов EhV и ScV. Исследования вируса ScV еще не завершены и будут продолжены.

С помощью оптического микроскопа получены данные о динамике контакта альговирусов и их хозяев-микроводорослей. В ходе изучения черноморских альговирусов и вирусного лизиса показано, что после 4 ч контакта альговирусов и микроводоросли *T. viridis* подвижность клеток микроводоросли снижалась, а после 8 ч контакта появлялись деформированные (разбухшие) клетки, оболочки которых затем разрывались, а содержимое изливалось в окружающую среду (Степанова, 2004).

Таким образом, предварительное изучение изолированных вирусов, доступное даже для малооснащенных лабораторий, позволяет получить информацию о биологии и экологии выделяемых вирусов, которая может быть полезна для мониторинга (определения сезонности), титрования и уточнения инкубационного периода альговирусов.

*Классические вирусологические методы,  
использованные при изучении черноморских  
альговирусов*

Для более детального изучения черноморских альговирусов применяли электронную микроскопию и такие биохимические методы, как электрофорез вирусных белков, определение принадлежности нуклеиновой кислоты, секвенирование вирусных геномов и их анализ с помощью компьютерных программ. Использовали также приборы, предназначенные для общебиологических исследований, например, микрокалориметр или монитор тепловой (биологической) активности (МБА) (Thermal Activity Monitor LKB 2277, Швеция) и ультрачувствительный флуориметр ToxY-РАМ (Walz, Германия). Принципы и особенности применения этих приборов при исследовании черноморских альговирусов подробно изложены ранее (Степанова, 2004; Stepanova,

2014). Для изучения черноморских альговирусов применяли имеющуюся приборную базу Ин-БЮМ (эпифлуоресцентный и оптический микроскопы, МБА), но чаще использовали приборы, методы и компьютерные программы, принадлежащие материально-техническим базам других научных и практических подразделений России, Украины, Норвегии и США.

Биохимические исследования позволили установить принадлежность нуклеиновых кислот (НК) разных штаммов альговирусов микроводоросли *T. viridis*, провести анализ их белкового спектра, определить размер геномов, а также выполнить исследования по секвенированию геномов черноморских альговирусов (Степанова, 2004; Степанова и др., 2005, 2013). По результатам исследования при помощи электрофореза белкового спектра черноморских альговирусов микроводоросли *T. viridis* обнаружено около 40 вирусных белков черноморских альговирусов этой микроводоросли. Использование комплекта реагентов “РИБО-сорб” для выделения РНК/ДНК позволило подтвердить принадлежность к ДНК вирусных НК, выделенных из концентрированных вирусных суспензий. Исследования проводили на базе Главного военного клинического госпиталя (Украина, Киев). Размер геномов альговирусов штаммов TvV-S20, TvV-S11 и DvV-S12 определяли в электрофорезе, используя в качестве маркера НК TvV-S1, принадлежность которой к ДНК и размер (20–23 kbp) были определены в Бергенском университете (Норвегия).

В соответствии с программой международного проекта “Marine Phage, Virus & Virome Sequencing Project” (Broad Institute, MIT, USA) геномы трех штаммов черноморских альговирусов были секвенированы, ассемблированы и аннотированы исследователями Broad Institute (см.: Henn et al., 2010); полученные результаты представлены в базы данных CAMERA и NCBI. Предварительный анализ геномов штаммов TvV-S20, TvV-S11 и DvV-S12 черноморских альговирусов, проведенный с помощью компьютерной программы (Shcherbatenko, 2012), выявил их сходство с наиболее изученными вирусами микроводорослей семейства Phycodnaviridae, обнаружив при этом уникальность и индивидуальные особенности исследованных штаммов, основанные на космополитной комбинации их генов (Степанова и др., 2013).

По результатам электрофореза выявлено около 40 вирусных белков альговируса микроводоросли *T. viridis*, а по данным CAMERA — 55; при анализе с помощью компьютерной программы выявлено свыше 80 белков. Таким образом, анализ генетических данных оказался наиболее эффективным методом при обнаружении вирусных белков.

Электронно-микроскопические и биохимические исследования, в том числе секвенирование вирусных геномов и их анализ, позволили пополнить знания о биологии альговирусов и стали до-

полнительным аргументом для включения обнаруженных в Чёрном море альговирuсов в семейство Phycodnaviridae.

### Модельные эксперименты

В результате поиска, изоляции, изучения и мониторинга морских вирусoв создана коллекция черноморских альговирuсов, которая в настоящее время поддерживается на базе ИПТС. Коллекция черноморских альговирuсов используется для выполнения модельных экспериментов и/или исследований.

Модельные эксперименты с применением прибора МБА показали, что контакт альговирuсов и раствора ДНК сопровождался повышением теплопродукции с кооперативным переходом, а под влиянием тетра nukлеотидов гуанин-цитозин-гуанин-цитозин происходило угнетение инфекционного титра некоторых штаммов альговирuсов (Степанова, 2004; Stepanova et al., 2003; Stepanova, 2005, 2014). Мы полагаем, что в природе это явление может играть роль регулятора активной вирусной инфекции, плавно останавливая процесс гибели хозяев-микроорганизмов и сохраняя их как вид, что не противоречит, а дополняет существующую концептуальную модель вирусного контроля разнообразия сообществ хозяев (Wommack, Colwell, 2000).

В модельных экспериментах установлено, что мидия *M. galloprovincialis* может утилизировать (усваивать и накапливать в тканях и органах) до 99% альговирuсов из воды (Степанова, 2017а). Выявлена зависимость этого показателя от продолжительности опыта, сложности морфологии вируса, возраста (размера) моллюска и наличия неиндикаторной для вируса микроводоросли; ее присутствие приближает эксперимент к природным условиям, способствует удержанию вирусoв в псевдофекалиях и ускоряет их утилизацию мидиями. Установлено, что часть альговирuсов концентрируется в организме фильтрующих моллюсков и возвращается в окружающую среду с фекалиями, поступая на дно, где может быть использована бентофагами, и/или диффундирует обратно в пелагиаль. Полученные результаты свидетельствуют об участии двустворчатых моллюсков в циркуляции морских вирусoв.

Экспериментальное изучение контакта культуры морской микроводоросли *T. viridis* с альговирuсом (штамм TsV-S1) показало, что в условиях непрерывного искусственного освещения вирусное инфицирование клеток водорослей при интенсивности света 60 мкЭ/(м<sup>2</sup> с) отмечалось через сутки после заражения культуры, а при 20 мкЭ/(м<sup>2</sup> с) – через двое суток (Степанова, 2019). Инфицированные и неинфицированные клетки различались по форме и размерам. При интенсивности света 60 мкЭ/(м<sup>2</sup> с) инфицированная культура начинала отмирать в конце третьих су-

ток при численности клеток  $3 \times 10^5$  кл./мл, а при освещении 20 мкЭ/(м<sup>2</sup> с) – в начале пятых суток при такой же численности. В условиях низкой интенсивности света полный лизис водорослей происходил к концу шестых суток; при увеличении интенсивности света в 3 раза этот процесс сокращался до четырех суток. Ранее контакт культуры морской микроводоросли *T. viridis* с альговирuсом (штамм TsV-S1) в условиях комнатной температуры и освещенности изучали в оптическом микроскопе, а также по уровню теплопродукции с использованием метода микрокалориметрии (Степанова, 2004; Stepanova, 2006, 2014). Использование метода микрокалориметрии в сочетании с другими методами расширило знания о динамике контакта микроводорослей и альговирuсов, а также позволило получить объективные результаты, подкрепленные цифровыми данными и графическими изображениями. Установлено, что через 4 ч теплопродукция инфицированной культуры микроводоросли незначительно отличалась от таковой в контроле (без вируса). Через 8–10 ч после заражения теплопродукция инфицированной культуры была уже в 3 раза ниже, чем в контроле, но визуальные различия между опытом и контролем через 10 ч отсутствовали. Однако использование оптического микроскопии позволило увидеть, что уже через 4 ч подвижность инфицированных клеток значительно сокращалась по сравнению с таковой клеток в контрольном образце культуры. Различия между контролем и опытом, видимые невооруженным глазом, обычно наблюдались через 20–24 ч: в опыте был виден осадок, надосадочная жидкость была прозрачной; в контроле культура сохраняла зеленый цвет, наиболее интенсивный у поверхности. На этом этапе теплопродукция контрольного образца была в 3.5 раза выше, чем опытного. Спустя несколько суток осадок в опыте терял цвет, а в контроле интенсивность окраски практически не изменялась; теплопродукция в опыте снижалась до 0.5 мкВт. Это можно объяснить тепловыделением при росте и развитии бактериальной флоры, так как в экспериментах используются альгологически чистые культуры, в которых не исключено присутствие бактерий. Теплопродукция контрольной культуры достигала 11 мкВт, что свидетельствовало о продолжающемся росте и развитии микроводорослей. Инфицирование основной массы клеток, вероятно, происходило в течение первых четырех часов контакта микроводоросли *T. viridis* с альговирuсом TvV-S1 и сопровождалось снижением двигательной активности клеток. Это отражалось на уровне теплопродукции инфицированной культуры. Разница между количеством выделяемого тепла в контроле и в опыте через 8 ч после начала эксперимента указывает на угнетение метаболизма у инфицированной культуры. На этом этапе в опытных образцах наблюдали разрыв клеточных оболочек и разрушение отдельных клеток микроводоросли.

В контроле клетки водоросли были активными, нарушений их целостности не отмечено. Через 24 ч в надосадочной жидкости инфицированной культуры клетки микроводорослей отсутствовали, а в осадке присутствовали неподвижные часто деформированные клетки, оболочки которых разрушались. Очевидно, при разрыве (лизисе) клеток происходит выход созревших вирионов во внешнюю среду. К этому времени разница между уровнями теплопродукции в опыте и контроле была самой большой.

Особый интерес представляют исследования по влиянию вирусов гидросферы и вирусного лизиса на физические параметры водной среды, в которой они обитают. Результаты модельных экспериментов по изучению черноморских альговирусов позволяют утверждать, что морские вирусы и их вирусный лизис необходимо учитывать как в теории, так и в практике физики моря, в том числе в оптике. Для проведения модельных экспериментов по изучению влияния вирусного лизиса на электрическую проводимость (ЭП) и прозрачность морской воды были созданы лабораторная установка и экспериментальный лабораторный стенд, которые были подробно описаны ранее (Степанова, Гайский, 2018; Степанова и др., 2018; Шоларь, Степанова, 2019; Шоларь и др., 2019). В настоящее время создана и находится на стадии модернизации двухъярусная лабораторная установка, использование которой позволит одновременно получать результаты по динамике изменения ЭП и прозрачности морской воды как в опыте (контакт культуры микроводоросли с альговирусом), так и в контроле (рост и развитие культуры микроводоросли без вирусного лизиса).

Известно, что простейшие одноклеточные организмы могут влиять на состояние и величину электрической энергии в гидросфере. В водной среде микроорганизмы в процессе жизнедеятельности изменяют окислительно-восстановительный потенциал, концентрацию водородных ионов и метаболитов, а также генерируют электрические поля. Показано, что локальная неоднородность электрического поля акватории помимо гидродинамических и химических факторов может определяться также жизнедеятельностью бактерио-, фито- и зоопланктона. На изменение электрического потенциала водной среды в результате жизнедеятельности гидробионтов влияют их генотип, функциональное состояние и адаптационный фактор (Александров, 1985). Естественно, что функциональное состояние одноклеточных гидробионтов изменяется при их контакте с вирусами, что позволяет говорить о влиянии вирусного лизиса на электрический потенциал водной среды их обитания, в том числе на изменение ЭП воды. Клетки микроводоросли-хозяина оказывают определенное влияние на ЭП среды, а вирусы, разрушая клетки микроводоросли, приводят к снижению ЭП. Вероятно, этим можно объяснить снижение ЭП морской воды в процессе контакта

микроводоросли и альговирусов на фоне повышения температуры воды, которое мы наблюдали в экспериментах (Степанова, Гайский, 2018; Степанова и др., 2018), хотя это противоречит принятой физической зависимости. Снижение ЭП жидкости (смеси на основе морской воды) отмечено в период лизиса клеток культур микроводорослей соответствующими альговирусами. Микродепика численности фитопланктона с последующим вирусным лизисом, созданная в культуре, соответствует микродепике сезонного вирусного пика в природе. Таким образом, экспериментально полученные результаты снижения ЭП морской воды при вирусном лизисе позволяют предположить, что в сезонные пики численности фитопланктона, за которыми следуют пики численности альговирусов, в акваториях должно наблюдаться изменение ЭП. Каким будет характер этого изменения — местным, локальным или повсеместным, т.е. глобальным, еще предстоит изучить. Мы не обнаружили литературных данных о динамике ЭП морской воды, связанной с сезонными пиками численности морских микроорганизмов (бактерио-, фито-, вириопланктона). В то же время результаты проведенных нами экспериментов с учетом требований по точности, предъявляемых к действующему международному уравнению состояния морской воды TEOS-10 (см.: IOC, SCOR and IAPSO, 2010), позволяют утверждать, что это влияние существенно.

В лабораторных условиях с использованием микробиоты в основном тихоокеанских регионов изучены и описаны оптические параметры жидкой среды в процессе вирусного лизиса (Balch et al., 2002; Simis et al., 2005, 2007; Uitz et al., 2010). Исследования нацелены на изучение процесса вирусного лизиса с учетом многих меняющихся показателей, таких как численность клеток; количество пигментов; размеры органических частиц, образующихся в результате вирусного лизиса; степень их агрегации; химический состав среды и т.д. Характерные изменения, обнаруженные в ходе вирусного лизиса в условиях эксперимента, предложено использовать для индикации вирусного лизиса в гидросфере и для выявления массовой смертности одноклеточных хозяев в водоемах на основе оптического дистанционного зондирования. Однако значение вирусов и вирусного лизиса в изменении физических характеристик водной среды их обитания не рассматривалось, а вирусы не учитывались в качестве активных компонентов физики и оптики гидросферы. Сведения (в том числе экспериментальные) о роли черноморских вирусов (альговирусов) в изменении прозрачности акватории Чёрного моря до недавнего времени также отсутствовали. Для определения роли черноморских альговирусов и вирусного лизиса в изменении прозрачности среды их обитания был выполнен ряд модельных экспериментов с использованием черноморской микробиоты — культур микроводорослей и суспензий

альговирюсов (Степанова и др., 2018; Шоларь, Степанова, 2019; Шоларь и др., 2019). Изменение прозрачности морской воды в экспериментах фиксировали при помощи малогабаритного мультиспектрального измерителя показателя ослабления направленного света (ПОС) – СИПО (Латушкин, 2013) с применением двухъемкостного экспериментального лабораторного стенда, где в одном из опытов использовали культуру микроводоросли *D. viridis* в контакте с вирусной суспензией альговирюса DvV-S11, а в контроле – только культуру микроводоросли *D. viridis* без вирусa. Полученные результаты свидетельствуют о влиянии вирусного лизиса на прозрачность морской воды и частично объясняют аномалии оптических свойств воды, наблюдаемые в разных океанических регионах, что является оригинальным дополнением к уже существующим предположениям и объяснениям (Organelli et al., 2017). Предположение о связи вирусного лизиса с аномалиями оптических свойств морской воды, например, с быстрым изменением прозрачности в динамике пика цветения фитопланктона, указывает на необходимость учета в теории и практике физики и оптики моря пока еще мало изученного вклада морских (водных) вирусюв.

Таким образом, анализ опубликованных данных по поиску, изоляции и изучению черноморских альговирюсов показал, что в ходе исследований помимо классических методов могут успешно применяться методики, усовершенствованные и/или разработанные авторами обзора. Использование этих методик позволило изолировать и изучить новые для науки и для экосистемы Чёрного моря вирусю микроводорослей и одного вида цианобактерий.

Клинический материал и материал, полученный от гидробионтов, стали новыми источниками для изоляции альговирюсов, что позволило заметно расширить знания по экологии морских вирусюв. Новые для науки данные получены в результате модельных экспериментов; разработаны уникальная лабораторная установка и экспериментальный стенд для исследования вирусного лизиса.

На основании результатов поиска и изоляции альговирюсов из проб морской воды, отобранной в бухтах у г. Севастополь, мониторинг альговирюсов предложено использовать в качестве экологического индикатора и как составляющую экомониторинга, а альговирюсы рассматривать как биологические индикаторы и/или маркёры.

В результате проведенного экспериментального изучения вирусного лизиса одноклеточных микроводорослей-хозяев с использованием созданных лабораторных установки и стенда выявлены новые для физики и оптики моря факты на уровне биофизических процессов контакта вирусю и хозяина. Полученные данные позволяют обосновать и упрочить представления о морских (вод-

ных) вирусюв и вирусном лизисе как об активных физических и оптических компонентах (элементах) в гидросфере, которые необходимо учитывать в теории и практике физики моря.

Краткое описание методологии поиска, изоляции и изучения черноморских альговирюсов, в том числе модельных экспериментов, и полученных результатов может послужить стимулом для активизации морской (водной) вирусологии в научных учреждениях как нашей страны, так и за рубежом, где это новое научное направление еще не получило должного развития.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания по госбюджетной теме ИПТС № 0012-2019-0003 “Разработка новых средств и измерительных информационных технологий исследований природных вод” и по теме № 0827-2019-0002 МГИ РАН.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Александров В.В. Электрофизика пресных вод. Л.: Гидрометеиздат. 1985. 184 с.
- Декларационный патент на изобретение 65864А UA, MKU 7 C12 N 1/12. Спосіб ізоляції альговірусів однокілтінних водоростей, наприклад *Platymonas viridis* Rouch (Chlorophyta) / Степанова О.А. (UA); заявник Інститут біології південних морів ім. О.О. Ковалевського НАН України (UA). № 2003065499; заявл. 13.06.2003; опубл. 15.04.2004 // Промислова власність. Офіційн. бюл. 2004. № 4.
- Дрюккер В.В., Дутова Н.В. Изучение морфологического разнообразия бактериофагов озера Байкал // Докл. Акад. наук. 2006. Т. 410. № 6. С. 847–849.
- Дрюккер В.В., Дутова Н.В. Бактериофаги как новое трофическое звено в экосистеме глубоководного озера Байкал // Докл. Акад. наук. 2009. Т. 427. № 2. С. 277–281.
- Дрюккер В.В., Дутова Н.В., Ковадло А.С. и др. Вирусологический и бактериологический мониторинг экосистемы олиготрофного озера Байкал // Проблемы устойчивого функционирования водных и наземных экосистем: Материалы междунаро. науч. конф. (Ростов-на-Дону, 9–12 октября 2006 г.). Ростов-на-Дону: Изд-во РГУ. 2006. С. 118–121.
- Дрюккер В.В., Дутова Н.В., Ковадло А.С., Косторнова Т.Я. Размерная структура, сезонная динамика и вертикальное распределение бактериофагов озера Байкал // Изв. ИрГУ. Науки о Земле. 2008. Т. 1. № 1. С. 189–197.
- Дрюккер В.В., Дутова Н.В., Ковадло А.С. Вириопланктон и бактериопланктон высокогорного озера Хуб-



- сугул (Монголия) // Докл. Акад. наук. 2011. Т. 440. № 2. С. 282–285.
- Дутова Н.В., Дрюккер В.В. Морфологические и размерные характеристики вирусов озера Байкал // Гидробиол. журн. 2009. Т. 45. № 4. С. 82–89.
- Дутова Н.В., Дрюккер В.В. Вирусное сообщество биопленок, формирующихся на различных субстратах в природных условиях озера Байкал // Докл. Акад. наук. 2013. Т. 450. № 4. С. 468–470.
- Копылов А.И. Роль вирусов в структуре и функционировании микробных сообществ в пресноводных экосистемах // Журн. Сиб. фед. ун-та. Биология. 2013. Т. 6. № 4. С. 354–367.
- Копылов А.И., Косолапов Д.Б., Заботкина Е.А. Вирусы в планктоне Рыбинского водохранилища // Микробиология. 2007. Т. 76. № 6. С. 879–887.
- Копылов А.И., Косолапов Д.Б., Заботкина Е.А. Распределение вирусов и их влияние на бактериопланктон в эвтрофном и мезотрофном водохранилищах // Биол. внутренних вод. 2008. № 1. С. 49–57.
- Копылов А.И., Косолапов Д.Б., Заботкина Е.А., Страшкрабова В. Распределение пикоцианобактерий и вириопланктона в мезотрофном и мезоэвтрофном водохранилищах: роль вирусов в смертности пикоцианобактерий // Изв. РАН. Сер. биол. 2010. № 6. С. 661–669.
- Копылов А.И., Косолапов Д.Б., Заботкина Е.А. Влияние вирусов на гетеротрофный бактериопланктон водохранилищ // Микробиология. 2011. Т. 80. № 2. С. 241–250.
- Латушкин А.А. Многоканальный измеритель коэффициента ослабления света для проведения океанографических подспутниковых исследований // Современные технологии проектирования управляющих и мехатронных систем: Материалы международ. науч. конф. (Севастополь, 16–19 апреля 2013 г.). Севастополь: Изд-во СевНТУ. 2013. С. 231–236.
- Лихошвай Е.В. В каждой капле воды – вирусы // Наука из первых рук. 2016. Т. 70. № 4. С. 88–94.
- Патент 97293 С2 UA, МПК С12N 1/12. Спосіб ізольції альговірусів мікроводорості *Phaeodactylum tricornerutum* (Bacillariophyta) з проб морської води / Степанова О.А. (UA); заявник Інститут біології південних морів ім. О.О. Ковалевського НАН України (UA). № а 2010 03881; заявл. 06.04.2010; опубл. 25.01.2012 // Промислова власність. Офіційн. бюл. 2012. № 2. С. 3–91.
- Стельмах Л.В., Степанова О.А. Влияние вирусной инфекции на развитие зеленой водоросли *Tetraselmis viridis* в культуре // Системы контроля окруж. среды. 2019. № 2 (36). С. 93–99.
- Степанова О.А. Морские бактерии и вирусы в воде и донных осадках бухт Севастополя // Экология. 2001. № 1. С. 61–63.
- Степанова О.А. Экология аллохтонных и автохтонных вирусов Черного моря. Севастополь: Мир. 2004. 308 с.
- Степанова О.А. Некоторые сведения о вириопланктоне и его отдельных представителях // Успехи соврем. биол. 2005. Т. 125. № 6. С. 543–555.
- Степанова О.А. Сезонность контаминации рыб альговиррусами (Черное море) // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов: Материалы международ. науч.-практ. конф. (Борк, 17–20 июля 2007 г.). М.: Россельхозакадемия. 2007. С. 273–277.
- Степанова О.А. Черноморские альговиррусы // Биол. моря. 2016. Т. 42. № 2. С. 99–103.
- Степанова О.А. Взаимодействие альговиррусов и мидии *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 (Bivalvia: Mytilidae) в условиях эксперимента // Биол. моря. 2017а. Т. 43. № 2. С. 97–101.
- Степанова О.А. Результаты поиска альговиррусов – отражение географического распространения микроводорослей // Экологическая, промышленная и энергетическая безопасность – 2017: Сб. ст. по материалам научно-практ. конф. с международ. участием (Севастополь, 11–15 сент. 2017 г.). Севастополь: Изд. СевГУ. 2017б. С. 1284–1288.
- Степанова О.А. Ответные реакции вирусов гидросферы и их одноклеточных хозяев на экологические факторы // Системы контроля окруж. среды. 2018а. № 12 (32). С. 99–108.
- Степанова О.А. Результаты мониторинга черноморских альговиррусов в бухтах Севастополя и Крыма (2002–2018 гг.) // Системы контроля окруж. среды. 2018б. № 14 (34). С. 122–127.
- Степанова О.А. Мониторинг альговиррусов индикаторных к экологической ситуации микроводорослей *Tetraselmis viridis* и *Phaeodactylum* в бухтах Севастополя (2002–2018 гг.) // Уч. зап. Крымского фед. ун-та им. В.И. Вернадского. Биология. Химия. 2018в. Т. 4 (70). № 3. С. 174–181.
- Степанова О.А., Бойко А.Л., Гордиенко А.И. и др. Характеристика вируса *Tetraselmis viridis* Norris (Chlorophyta, Prasinophyceae) // Докл. НАН Украины. 2005. № 1. С. 158–162.
- Степанова О.А., Бойко А.Л., Щербатенко И.С. Компьютерный анализ геномов трех морских альговиррусов // Микробиол. журн. 2013. Т. 75. № 5. С. 76–81.
- Степанова О.А., Гайский П.В. Динамика изменений электрической проводимости морской воды под влиянием биотической составляющей в условиях эксперимента // Системы контроля окруж. среды. 2018. № 11 (31). С. 48–56.
- Степанова О.А., Гайский П.В., Шоларь С.А. Влияние вирусного лизиса на некоторые физические параметры морской воды в условиях эксперимента // Системы контроля окруж. среды. 2018. № 13 (33). С. 19–28.
- Степанова О.А., Галатонова О.А. Определение вида микроводоросли с использованием альговирруса // Водоросли: проблемы таксономии, экологии и использование в мониторинге: Материалы II всерос. конф. (Сыктывкар, 5–9 октября 2009 г.). Сыктывкар: Институт биологии Коми НЦ УрО РАН. 2009. С. 33–34.
- Степанова О.А., Климчук Д.А., Новиченко В.Н. Первая изоляция альговирруса *Dunaliella viridis* Teod. (Chlorophyta) из черноморской среды // Докл. НАН Украины. 2009. № 11. С. 165–168.
- Степанова О.А., Кузьминова Н.С. Контаминация морских рыб альговиррусами // Рыб. хоз-во Украины. 2006. № 1. С. 26–27.
- Степанова О.А., Стельмах Л.В. Поиск и изоляция нового альговирруса микроводоросли *Tisochrysis lutea* из экосистемы Черного моря в бухтах Севастополя (Крымский регион) // Экосистемы. 2017. № 12 (42). С. 28–34.
- Шоларь С.А., Степанова О.А. Изоляция альговиррусов из черноморской среды у побережья Севастополя (2002–2010 гг.) // Биол. внутренних вод: Материалы XIV школы-конференции молодых ученых

- (Борок, 26–30 октября 2010 г.). Ярославль: Принт-хаус. 2010. С. 183–190.
- Шоларь С.А., Степанова О.А. Результаты изменения оптических свойств морской среды в эксперименте при моделировании микропроцесса – вирусно-лизиса при контакте микроводорослей и альго-вирусов // Информ. системы и технологии – 2019. Сб. материалов XXV Международ. науч.-техн. конф. (Нижегород, 19 апреля 2019 г.). Н. Новгород: Изд. НГТУ им. П.Е. Алексеева. 2019. С. 901–907.
- Шоларь С.А., Степанова О.А., Стельмах Л.В. Использование экспериментального лабораторного стенда для изучения оптических свойств водной среды в присутствии микробиоты // Системы контроля окруж. среды. 2019. № 2 (36). С. 13–21.
- Balch W.M., Vaughn M. Jr., Novotny J.F. et al. Fundamental changes in light scattering associated with infection of marine bacteria by bacteriophage // *Limnol. Oceanogr.* 2002. № 47. P. 1554–1561.
- Coy S.R., Gann E.R., Pound H.L. et al. Viruses of eukaryotic algae: diversity, methods for detection, and future directions // *Viruses*. 2018. V. 9. № 10. P. 487–514.
- Henn M.R., Sullivan M.B., Stange-Thomann N. et al. Analysis of high-throughput sequencing and annotation strategies for phage genome // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 2. P. 9083–9095.
- IOC, SCOR and IAPSO, 2010: The international thermodynamic equation of seawater – 2010: Calculation and use of thermodynamic properties. Intergovernmental Oceanographic Commission. Manuals and Guides. № 56. UNESCO. 196 p.
- Manual of aquatic viral ecology. *Limnology and Oceanography e-Books*. American Society of Limnology and Oceanography. 2010. Ch. 1–19. 201 p.
- Middelboe M., Brussaard C. Marine viruses: key players in marine ecosystems // *Viruses*. 2017. V. 9. № 10. P. 302–308.
- Organelli E., Claustre H., Bricaud A. et al. Bio-optical anomalies in the world's oceans: an investigation on the diffuse attenuation coefficients for downward irradiance derived from Biogeochemical Argo float measurements // *J. Geophys. Res.: Oceans*. 2017. V. 122. № 5. P. 3543–3564.
- Pagarete A., Grébert T., Stepanova O. et al. Tsv-N1: A novel DNA algal virus that infects *Tetraselmis striata* // *Viruses*. 2015. V. 7. P. 3937–3953.
- Proposal for SCOR WG to investigate the role of viruses in marine ecosystems // *Proc. Sci. Comm. Oceanic Res.* (Venice, Italy, Sept. 2004). Baltimore, USA. 2005. V. 40. P. 66–70. (Annex 4).
- Shcherbatenko I.S. Graphical visualization of the biologically significant segments in the sequence sets of the relative plant viruses // *Mikrobiol. Zh.* 2012. V. 74. № 5. P. 108–115.
- Simis S.G.H., Tijdens M., Hoogveld H.L. et al. Optical changes associated with cyanobacterial bloom termination by viral lysis // *J. Plankton Res.* 2005. V. 27. № 9. P. 937–949.
- Simis S.G.H., Tijdens M., Hoogveld H.L. et al. Optical signatures of the filamentous cyanobacterium *Leptolyngbya boryana* during mass viral lysis // *Limnol. Oceanogr.* 2007. № 52. P. 184–197.
- Stepanova O.A. Influence of a tetranucleotide, CGCG, on marine algal viruses // *Ukr. Bioorg. Acta.* 2005. V. 2. № 1. P. 25–27.
- Stepanova O.A. Heat production of marine algae viruses contact with microseaweed // XIV Conf. ISBC. Sopot, Poland. 2–6 June 2006. P. 59–60.
- Stepanova O. Search, isolation and study of Black sea algal viruses 2002–2013. New facts and hypotheses. Saarbrücken: Lambert Acad. Publ. 2014. 56 p.
- Stepanova O.A., Shaida V.G., Boyko A.L. Study of heat production of interaction between DNA and viruses in vitro // A year after Johannesburg – Ocean governance and sustainable development: Ocean and coasts – A glimpse into the future (Kiev, 27–30 Oct. 2003). Kiev. 2003. P. 125–126.
- Stepanova O.A., Solovyova Y.A., Solovyov A.V. Results of algae viruses search in human clinical material // *Ukr. Bioorg. Acta.* 2011. № 2. P. 53–56.
- Suttle C.A. Marine viruses – major players in the global ecosystem // *Nat. Rev. Microbiol.* 2007. № 5. P. 801–812.
- Uitz J., Stramski D., Baudoux A.C. et al. Variations in the optical properties of a particle suspension associated with viral infection of marine bacteria // *Limnol. Oceanogr.* 2010. № 55. P. 2317–2330.
- Viruses of microorganisms. Caister Academic Press. 2018. 374 p.
- Wommack K.E., Colwell R.R. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000. V. 64. № 1. P. 69–114.
- Yolken R.H., Jones-Brando L., Dunigan D.D. et al. Chlorovirus ATCV-1 is part of the human oropharyngeal virome and is associated with changes in cognitive functions in humans and mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 45. P. 16106–16111.

## Materials, Methods and Experiments in the Study of the Black Sea Algal Viruses

O. A. Stepanova<sup>a</sup>, P. V. Gaisky<sup>a</sup>, and S. A. Sholar<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Institute of Natural and Technical Systems, Russian Academy of Sciences, Sevastopol 299011, Russia

<sup>b</sup>Marine Hydrophysical Institute, Russian Academy of Sciences, Sevastopol 299011, Russia

The major studies of the Black Sea algal viruses in Russia have been conducted at scientific institutes located in Sevastopol. A review of the methodological approaches used during the period of 2002–2019 shows that both classical virological methods and methods that were recently developed and patented (among them those by the authors) are applicable to the search, isolation, and study of algal viruses. The study of samples of clinical material and material of aquatic organisms, as well as model experiments, including those using a unique laboratory installation and a test stand, revealed new data on the biology and ecology of marine viruses. Based on the results from these studies, it was proposed to use algae viruses monitoring as a component in aquatic environment monitoring, in which algal viruses are considered as biological indicators and/or markers.

**Keywords:** algal viruses, microalgae, viral lysis, Black Sea, laboratory installation, test stand

УДК 582.261.1+581.162

## ПОЛОВОЕ ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ И ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ ПЕННАТНОЙ ДИАТОМОВОЙ ВОДОРОСЛИ *ENTOMONEIS* CF. *PALUDOSA* (W. SMITH) REIMER (BACILLARIOPHYTA)

© 2021 г. Ю. А. Подунай<sup>1</sup>, \*, Н. А. Давидович<sup>1,2</sup>, О. И. Давидович<sup>1</sup>, А. Витковский<sup>2</sup>, Р. Гастиньо<sup>2</sup>, Ч. Н. Солак<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского – природный заповедник РАН, филиал Института биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН, Феодосия 298188, Россия

<sup>2</sup>Институт морских и экологических наук, Щецинский университет, Щецин 70-383, Польша

<sup>3</sup>Университет Думлупинар, биологический факультет, Кютахья 43000, Турция

\*e-mail: grab-ua@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.04.2019 г.

После доработки 10.08.2020 г.

Принята к публикации 24.09.2020 г.

Впервые описаны половое воспроизведение и жизненный цикл морской пеннатной диатомовой водоросли *Entomoneis* cf. *paludosa*. Установлено, что в половом процессе участвуют два гаметангия, каждый производит по две гаметы. Для этого вида характерна морфологическая и поведенческая изогамия. Система скрещивания включает гетероталлический способ воспроизведения; случаи гомоталлизма не отмечены. Тип полового процесса близок к категории IC в системе Гайтлера.

**Ключевые слова:** диатомовые водоросли, половое воспроизведение, жизненный цикл, гамета, ауксо-спора, зигота, *Entomoneis paludosa*

DOI: 10.31857/S0134347521010083

Изначально под названием *Entomoneis* Эренберг описал подрод (Ehrenberg, 1845a), который затем повысил до уровня рода (Ehrenberg, 1845b). Типовым видом нового рода стал *Entomoneis alata* Ehrenberg (ранее *Navicula alata* Ehrenberg). В настоящее время семейство Entomoneida-seae состоит из двух родов – *Entomoneis* и *Platichthys* (Lange-Bertalot et al., 2015). Раунд с соавторами (Round et al., 1990) определили *Entomoneis* как род каналошовных пеннатных диатомовых водорослей, обитающих преимущественно в морских и солоноватых водоемах, изредка в пресных водах. Современные исследования показывают, что видовое разнообразие рода *Entomoneis* недооценено (Clavero et al., 1999; Paillès et al., 2014; Mejdandžić et al., 2017; Liu et al., 2018, и др.), а диапазоны ареалов, в которых можно найти его представителей, гораздо шире: *E. vertebralis* E. Clavero, J.O. Grimalt & M. Hernández-Mariné и *E. reimeri* D.C. Reinke & Wujek встречаются в естественных соляных болотах (Clavero et al., 1999); *E. gigantea* (Grunow) Nizamuddin и *E. kjellmanii* (Cleve) Poulin & Cardinal обитают в морских льдах (Poulin et al., 2011; Kudryavtseva et al., 2017); *E. triundulata* Bing Liu & D.M. Williams описан из пресноводного озера (Liu et al., 2018).

*Entomoneis paludosa* (W. Smith) Reimer – эпипеллический вид диатомей, обитающий в морских и солоноватоводных водоемах (Dalu et al., 2015). Голотип *E. paludosa* в оригинальной публикации Смита (Smith, 1853) описан как *Amphiprora paludosa*, а в 1975 г. переведен Реймером (Guiry, Guiry, 2020) в род *Entomoneis*. К настоящему времени сведения об этом виде дополнены описанием его морфологии и распространения в водах африканского континента (Dalu et al., 2015). Изучено влияние на рост и биохимический состав культур *E. paludosa* некоторых бактерий (Jauffrais et al., 2017), а также добавления цинка (Nguyen-Deroche et al., 2012).

Ауксоспорообразование у *Amphiprora alata* (в настоящее время *Entomoneis alata*) впервые отмечено Карстеном (Karsten, 1899), который привел рисунок пары инициальных клеток внутри оболочек аукоспор, окруженных пустыми теками родительских клеток. Однако изменение размеров в жизненном цикле вида и особенности полового воспроизведения на этапах гаметогенеза и сингамии до сих пор не описаны.

Диатомовые водоросли отличаются от других одноклеточных водорослей не только наличием кремниевого панциря, но и уникальным измене-

нием его размеров в жизненном цикле. С каждым вегетативным делением длина клеток прогрессивно уменьшается и возникает необходимость восстановления первоначальных размеров. Реституция обычно достигается в процессе полового размножения. Переход от вегетативного размножения к половому происходит после достижения клеткой определенной длины, которая у большинства видов составляет 45–55% от максимального видоспецифического размера (Davidovich, 2001). Таким образом, половое воспроизведение у диатомей – это обязательная жизненная стадия, необходимая для появления поколения с новыми генетическими комбинациями и для восстановления максимального видоспецифического размера клеток (Round et al., 1990; Edlund, Stoermer, 1997; Mann, 2011).

Представители рода *Entomoneis* широко распространены, встречаются постоянно, иногда достигают значительной численности и играют далеко не последнюю роль в морских экосистемах. Благодаря крупным размерам и необычной форме клеток, виды этого рода легко отличить в пробах. Однако данных о их биологии, как и сведений об этапе жизненного цикла, связанном с появлением новых поколений, крайне мало. Цель настоящей работы состояла в описании полового воспроизведения, жизненного цикла и системы скрещивания черноморского представителя рода *Entomoneis*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Виды рода *Entomoneis* обнаружены в эпилитоне и перифитоне Чёрного моря и изолированы из проб, собранных у побережья Крымского полуострова (клоны 7.0525-А, 7.0525-В, 7.0525-С – в Двужорной бухте; клон 7.0428-В – в Карадагской бухте около насосной станции; клоны 8.0727-А и 8.0727-В – на глубине 17 м у п-ва Тарханкут), а также у берега на набережной г. Сочи (клоны 7.0601-А, 7.0601-В, 7.0601-С, 7.0601-Д) и около г. Акчакоча, провинция Дюздже (Düzce Akçakoca) на северо-западе Турции (клон 7.0906-Д).

Клоны культивировали в среде, по составу близкой к среде ESAW (Andersen et al., 2005), модифицированной (Полякова и др., 2018) и разбавленной дистиллированной водой до необходимой солености (20‰). Клетки для клоновых культур выделяли микропипеточным методом (Andersen, Kawachi, 2005) под микроскопом МБС-9 (ЛОМО, СССР) и очищали путем многократного пересева в свежую среду. Культивирование проводили в стеклянных чашках Петри диаметром 5–9 см и высотой 0.9–1.4 см при наполнении среды от 8 до 45 мл в соответствии с размером чашки. Экспоненциальную фазу роста поддерживали, еженедельно пересевая культуры в свежую питательную среду. Чашки находились в изолированной

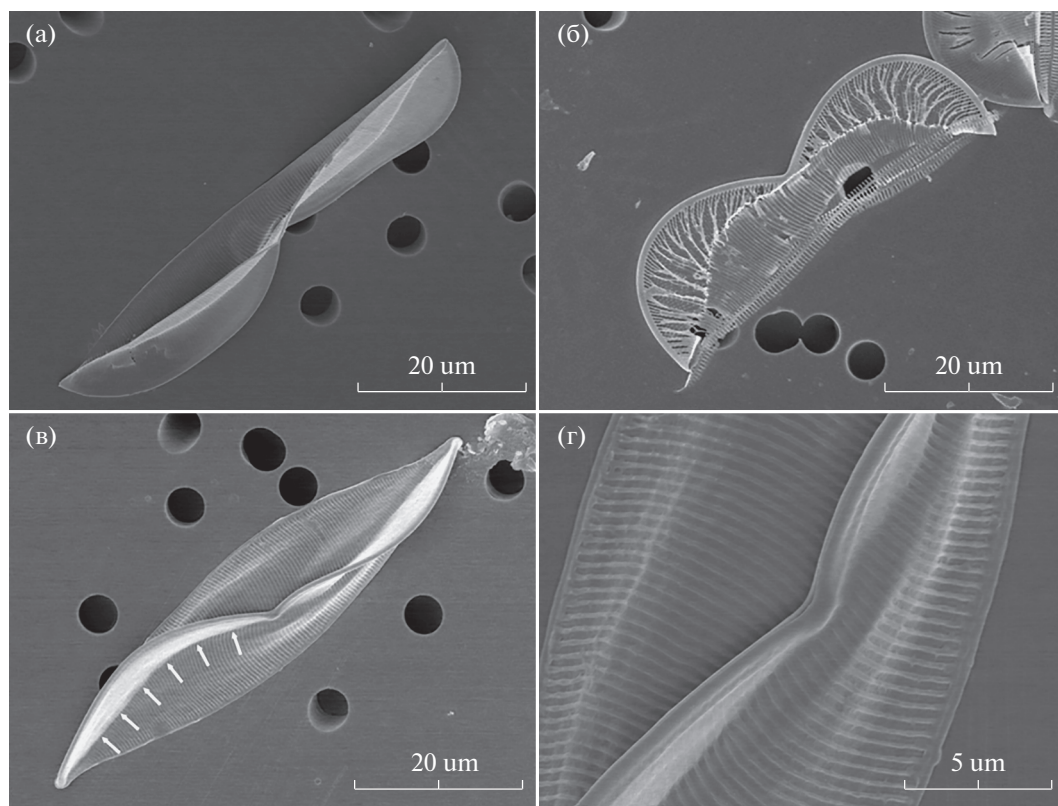
комнате с постоянной температурой  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  на полках у окон, обращенных на север, что обеспечивало естественные периодичность и уровень освещения.

Монокультуры регулярно просматривали под микроскопом для обнаружения случаев гомоталлического воспроизведения. Каждую неделю экспоненциально растущие культуры попарно смешивали для инициирования гетероталлического полового размножения; смешанные культуры в течение недели ежедневно просматривали под микроскопом, контролируя начало гаметогенеза и появление половых клеток. Обильность воспроизведения оценивали в баллах: 0 – случаи полового размножения не отмечены; 1 – наблюдаются единичные случаи гаметогенеза/ауксоспорообразования; 2 – случаи гаметогенеза/ауксоспорообразования встречаются часто, но их нельзя назвать массовыми; 3 – наблюдается массовое ауксоспорообразование.

Для исследования с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) клетки диатомовых водорослей очищали от органического материала кипячением в 35% перекиси водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) в течение 6 ч. Затем клеточную суспензию центрифугировали и 7–8 раз промывали дистиллированной водой. Несколько капель полученной суспензии помещали на алюминиевые столики, высушивали на воздухе и напыляли золотом. Препараты просматривали и фотографировали на СЭМ Hitachi SU8020.

За живыми клетками наблюдали под микроскопом Violar PI (PZO, Польша), настроенным по методам дифференциально-интерференционного контраста и освещения по Кёлеру (Федин, Барский, 1971). Клетки фотографировали с помощью цифровой фотокамеры Canon PowerShot A640. Размеры клеток определяли, используя окулярную линейку, калиброванную по объект-микрометру.

Для филогенетического анализа полные кодирующие области *rbcL* (рибулозо-1,5-бисфосфат-карбоксилазы/оксигеназы большой субъединицы рРНК) получали из предварительных сборок полного пластидного генома. Все анализы выполнены на платформе MEGAX (Kumar et al., 2018). С помощью программы ClustalW полученные последовательности гена *rbcL* выравняли с 48 последовательностями, доступными в базе данных BLAST для разных видов *Entomoneis/Amphiprora*. В качестве внешней группы использовали *Rhopalodia gibba* (Ehrenberg) O. Müller и *Epithemia parallela* (Grunow) Ruck & Nakov. Последовательности “обрезали” до конечной длины 1081 пара нуклеотидов. Филогенетическое дерево строили по методу максимального правдоподобия на основе модели GTR+I+G, используя



**Рис. 1.** Микрофотографии клеток морской пеннатной диатомовой водоросли *Entomoneis cf. paludosa* (СЭМ). Стрелками обозначена разделительная линия между килем и лицевой поверхностью створки.

1000 повторностей бутстрепа для определения поддержки ветвей.

Последовательности гена *rbcL* клонов, использованных в данной работе, депонированы в базе данных GenBank под номерами MT424815 (клон 7.0525-A), MT424816 (клон 7.0428-B) и MT424817 (клон 7.0906-D).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

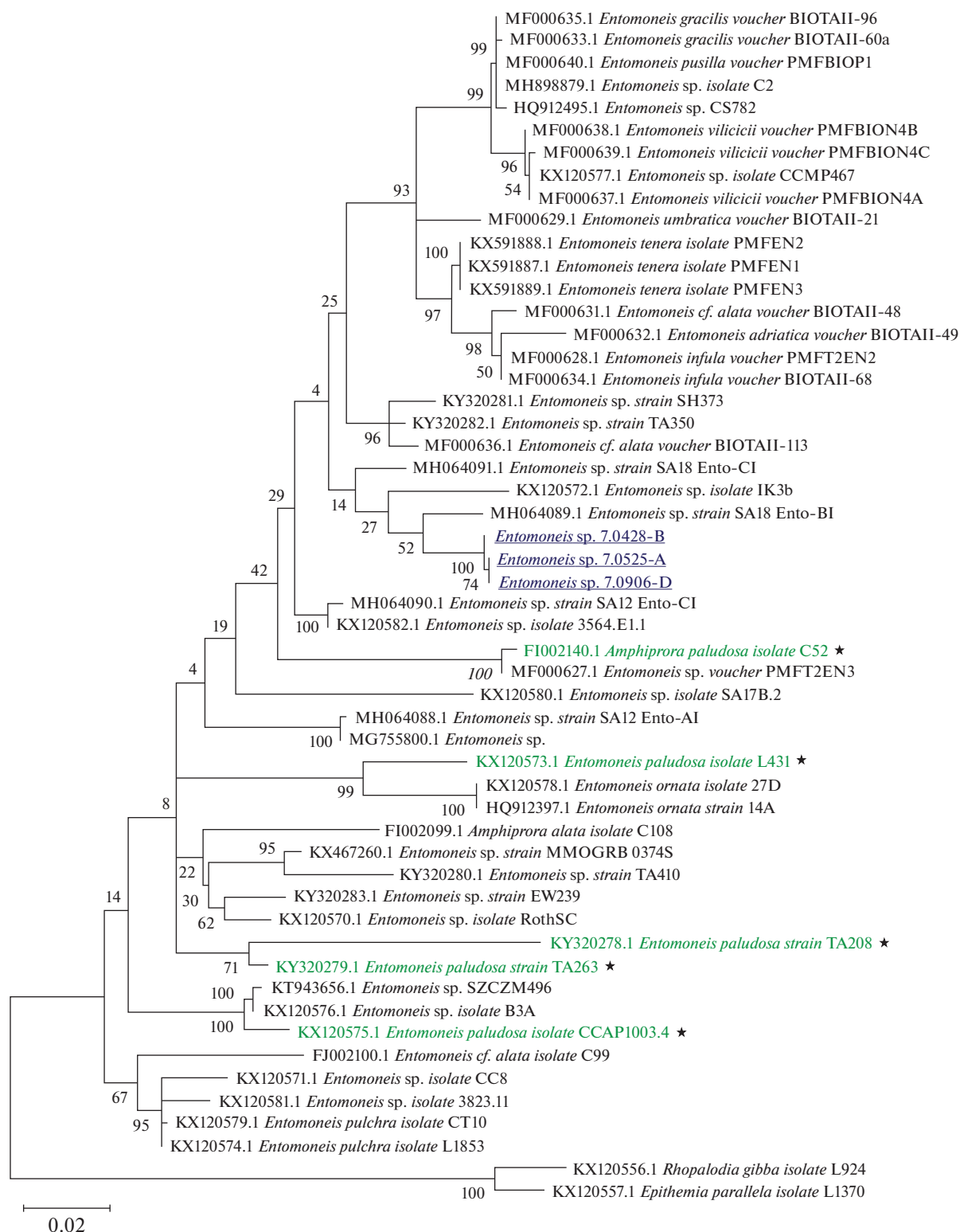
### Таксономическая характеристика

Клетки в выделенных клонах одиночные, с пояска прямоугольные или гитаровидные, перетянутые в средней части и скрученные по продольной оси (рис. 1). Клетка содержит один хлоропласт, образующий две лопасти. Створки линейно-ланцетные с перетяжкой, несущие узкий киль, уменьшающийся или исчезающий в центре створки и уменьшающийся у ее концов. Штрихи двухрядные и многорядные; образованы небольшими круглыми ареолами, закрытыми гименом снаружи и открытыми внутри. Шов S-образный, на проксимальном и дистальном концах клетки, как правило, прямой; расположен в трубчатом канале, перфорированном небольшими ареолами. Фибулы присутствуют. Вставочные ободки многочисленные, перфорированные.

Изолированные в культуру клетки имели ряд признаков, характерных для *Entomoneis paludosa*. Сравнение характеристик клонов с результатами исследования голотипа *E. paludosa* (W. Smith) Reimer (Dalu et al., 2015) показало, что клоны из культуры соответствовали голотипу *E. paludosa* по длине створки (41–63.5 мкм) и плотности штрихов (20–23 в 10 мкм) (рис. 1в–1г). Однако клетки выделенных нами штаммов имели гладкую (плавную) разделительную линию между килем и лицевой поверхностью створки (рис. 1в), тогда как у всех проиллюстрированных образцов голотипа линия разделения имела отчетливую выпуклость (Dalu et al., 2015).

Молекулярно-филогенетический анализ, выполненный с использованием гена *rbcL*, показал, что клоны, изолированные из проб с крымского и турецкого побережья Черного моря, образуют единый кластер внутри большой клады рода *Entomoneis* (рис. 2). При этом клоны, определенные разными авторами как *E. paludosa*, рассеяны по всему дереву и не образуют единой клады. Подобное положение штаммов свидетельствует о том, что под названием “*paludosa*” скрывается комплекс видов.

Размер вегетативных клеток *E. cf. paludosa*, содержащихся в культуре, варьировал от 18 до 128 мкм



**Рис. 2.** Филогенетическое дерево пеннатных диатомовых водорослей рода *Entomoneis*, построенное методом максимального правдоподобия на основе нуклеотидных последовательностей гена *rbcL*. Значение над ветвями – байесовские апостериорные вероятности. Подчеркиванием отмечены клоны, последовательности нуклеотидов которых получены нами. Звездочкой отмечены штаммы из базы данных GenBank, которые другие исследователи определили как *Entomoneis paludosa*.



**Таблица 1.** Апикальная длина клеток пеннатной диатомовой водоросли *Entomoneis* cf. *paludosa*

Стадия жизненного цикла	Длина клеток, мкм		N
	Min	Max	
Вегетативные клетки	18	128	522
Гаметангии	18	64	290
Инициальные клетки	88	128	171

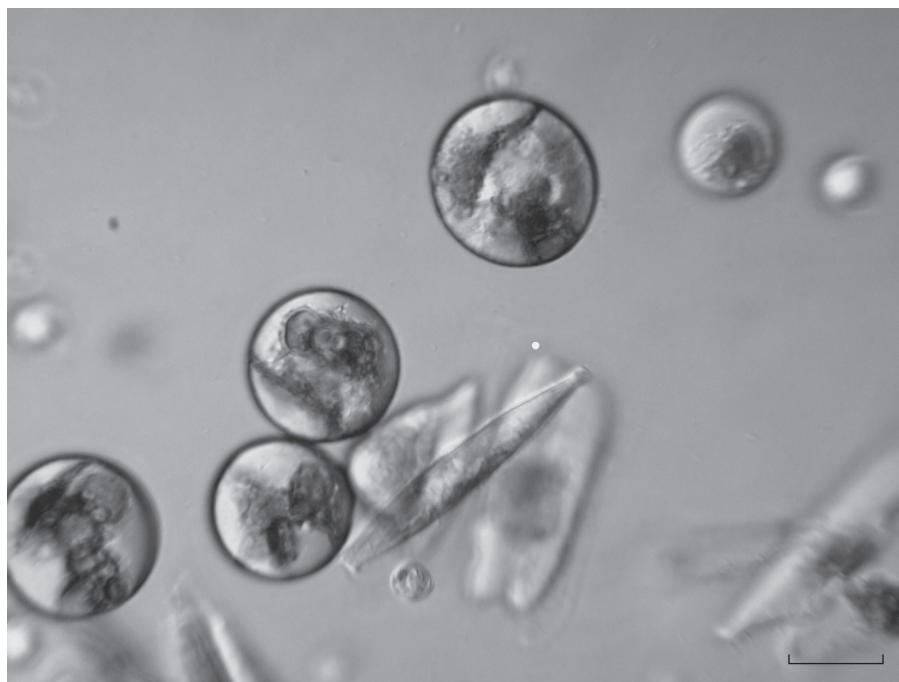
Примечание. Min – минимальная, Max – максимальная длина клеток, N – количество измерений.

(табл. 1). Между размером родительских клеток, участвовавших в половом процессе, и размером образовавшихся инициальных клеток корреляция не отмечена ( $R^2 = 0.114$ ). Для клонов *E.* cf. *paludosa*, содержащихся в культуре, скорость уменьшения размеров составила  $3.4 \pm 0.4$  мкм/мес.

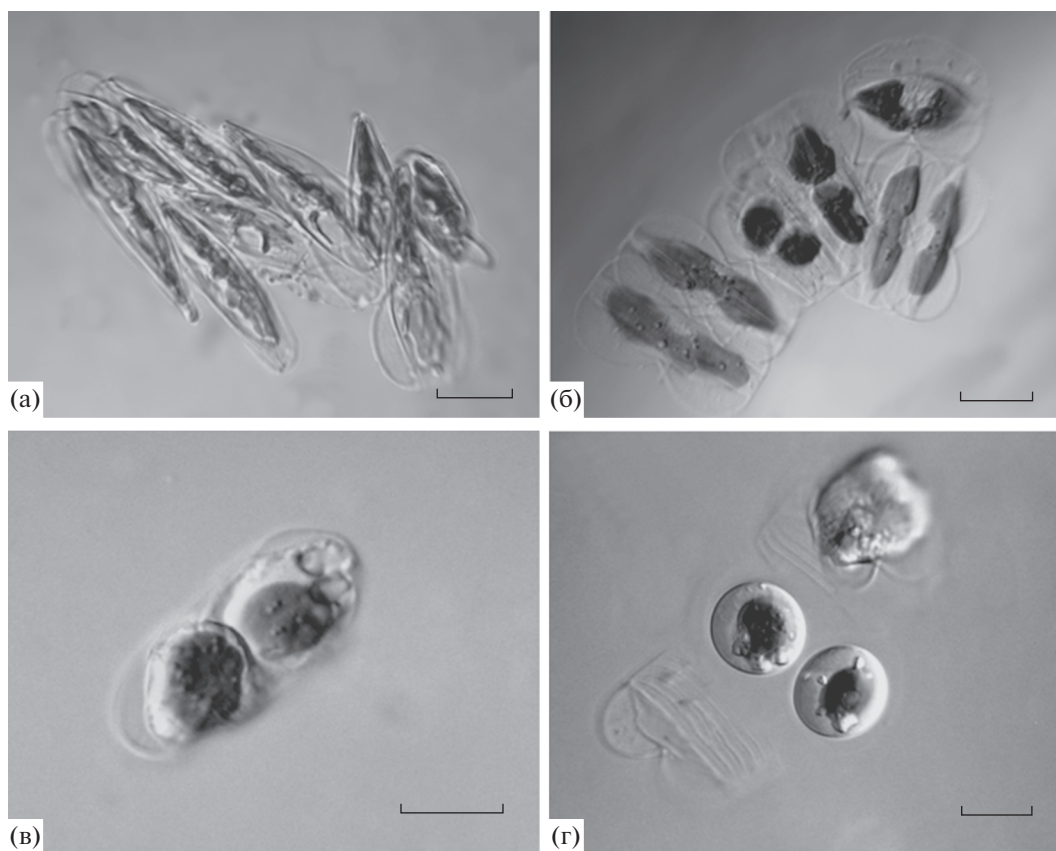
При длительном (более 10 сут) содержании клонов без пересева в свежую среду в культуре, находившейся в стационарной фазе или в фазе деградации, появлялись шарообразные образования (рис. 3), которые с первого взгляда можно было принять за гаметы или зиготы. Однако они имели разные размеры и иногда “неровную” форму. Раскрывшихся створок гаметангиев возле них не отмечено. Наблюдение за дальнейшими превращениями этих шаровидных образований показало, что в течение первых 3 сут они в разной степени увеличивались в диаметре, а через 5 сут начали разрушаться.

### Половое воспроизведение

В смешанных посевах в гетероталлическом половом процессе сначала участвует небольшое количество гаметангиев. В парах клонов аллогамный половой процесс можно наблюдать в разных местах чашки Петри на вторые-третьи сутки после скрещивания. На начало полового воспроизведения указывает появление в чашке групп клеток, находящихся в движении (рис. 4а). Деление содержимого гаметангиев проходит в трансапикальной плоскости (рис. 4б, 4в). В каждом гаметангии образуются две гаметы. Гаметы, округляясь и слегка увеличиваясь в размерах, раздвигают створки гаметангия и выходят в среду. Каждая гамета содержит по одному хлоропласту и окружена слабозаметной слизистой оболочкой (рис. 4г). Процесс копуляции гамет отследить сложно. Как только в одной из клеток начинается гаметогенез, к ней подползают клетки (иногда несколько десятков) обоих клонов, постепенно образуя по-



**Рис. 3.** Сферические структуры, образовавшиеся в переросшей культуре пеннатной диатомовой водоросли *Entomoneis* cf. *paludosa*. Шкала 20 мкм.



**Рис. 4.** Гаметогенез пеннатной диатомовой водоросли *Entomoneis cf. paludosa*. а – группа клеток в начале процесса гаметогенеза; б – клетки на разных этапах деления содержимого гаметангиев и образования гамет; в – сформировавшиеся гаметы готовы к выходу из гаметангия; г – сферические гаметы после выхода из гаметангия. Шкала 20 мкм.

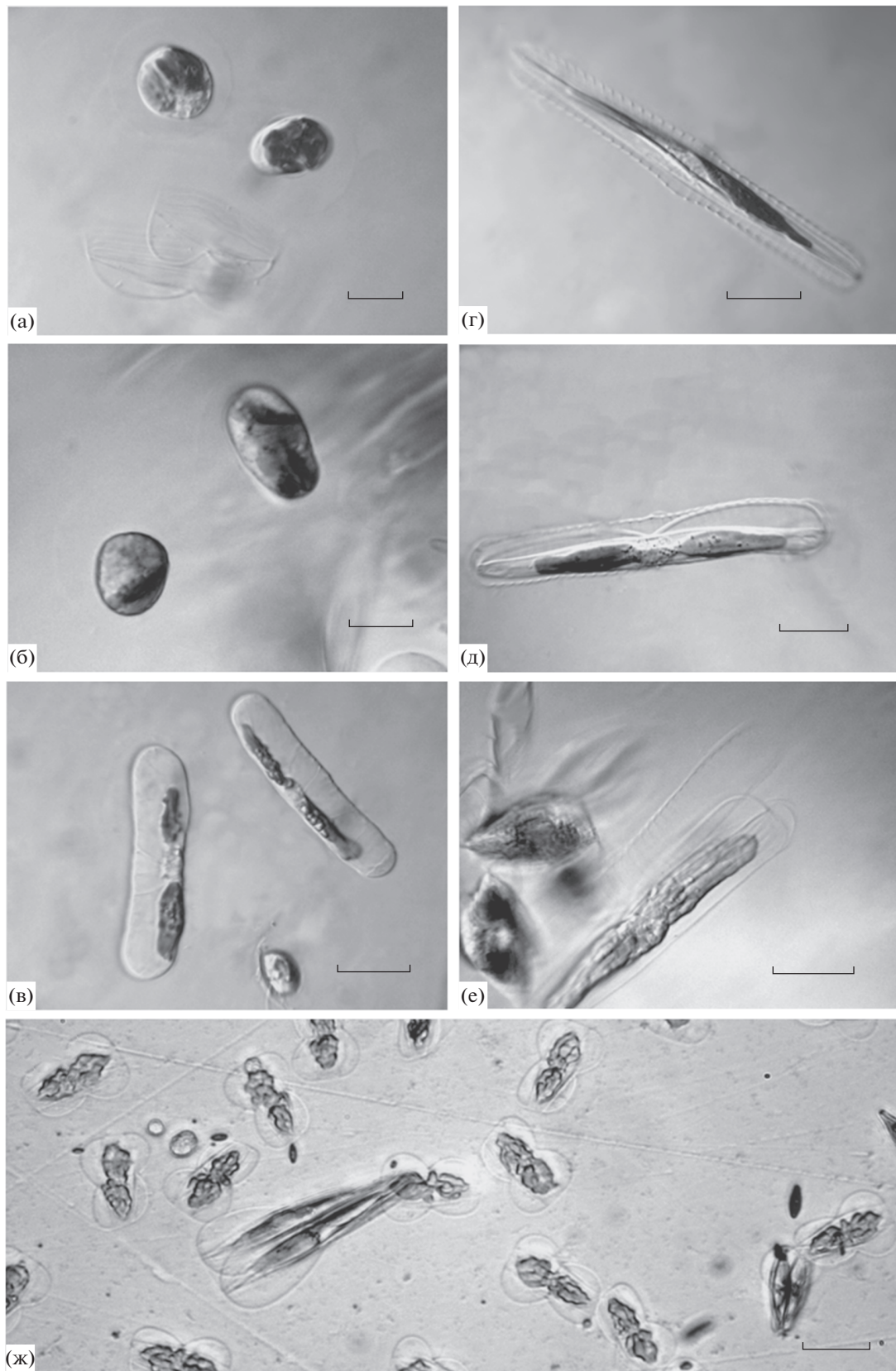
движную и все увеличивающуюся группу, в которой кроме клеток на разных этапах гаметогенеза могут находиться гаметы и уже образовавшиеся зиготы.

Образовавшиеся после сингамии сферические зиготы содержат 2 хлоропласта и располагаются рядом со створками гаметангия, но не имеют с ними тесной связи (рис. 5а). Через некоторое время зиготы биполярно удлиняются (рис. 5а–5в), превращаясь в ауксоспору. Ауксоспоры формируются как вблизи створок одного из гаметангиев, так и поодаль. Перизониум ауксоспоры хорошо развит, с различимыми в световой микроскоп поперечными полосами (рис. 5г). У ауксоспоры, завершившей рост, внутри перизониума откладываются створки инициальной клетки, форма которых не повторяет форму ауксоспоры и характерна для вегетативных клеток (рис. 5д). Когда инициальная клетка выходит из перизониума, его хорошо видно в световой микроскоп (рис. 5е). Инициальные клетки заметно больше материнских клеток (рис. 5ж).

#### Система скрещивания

За два года наблюдений и экспериментов по скрещиванию ни у одного клона *E. cf. paludosa* не обнаружен гомоталлический способ воспроизведения, тогда как во всех парах клонов (репродуктивно совместимых, подходящих по размеру и находящихся в экспоненциальной фазе роста) на вторые-третьи сутки начинался активный половой процесс. Все черноморские популяции, в том числе удаленные друг от друга популяции с крымского и турецкого побережья, оказались репродуктивно совместимыми. Клоны свободно скрещивались между собой в соответствии с условно выделенными типами спаривания (*mt1* и *mt2*) (табл. 2). Были изолированы инициальные клетки – потомки первого поколения (F1), образовавшиеся в результате гетероталлического воспроизведения клонов из двух популяций. Они оказались жизнеспособными и фертильными, и после достижения необходимого размера при содержании в культуре проявили способность к возвратному скрещиванию.





**Рис. 5.** Стадии формирования аукоспоры у *Entomoneis* cf. *paludosa*. а, б — образовавшиеся зиготы содержат два хлоропласта и начинают удлиняться; в — аукоспоры; г, д — внутри перизонима откладываются створки инициальной клетки; е — пустой перизоним и вышедшая из него инициальная клетка; ж — инициальные клетки по длине сильно отличаются от окружающих родительских клеток. Шкала 40 мкм.

**Таблица 2.** Гетероталлическое воспроизведение черноморских клонов пеннатной диатомовой водоросли *Entomoneis* cf. *paludosa*

Клоны	Место отбора проб	Происхождение клонов	Тип спаривания	Клоны											
				7.0525-A	7.0525-B	7.0525-C	7.0601-A	7.0601-B	7.0601-C	7.0601-D	7.0906-D	8.0727-A	8.0727-B	8.0228-A	8.0228-B
7.0525-A	Крым	w	<i>mt1</i>												
7.0525-B	Крым	w	<i>mt2</i>	3											
7.0525-C	Крым	w	<i>mt1</i>	0	3										
7.0601-A	Крым	w	<i>mt1</i>	0	3	0									
7.0601-B	Крым	w	<i>mt2</i>	2	0	3	2								
7.0601-C	Крым	w	<i>mt2</i>	2	0	3	3	0							
7.0601-D	Крым	w	<i>mt2</i>	3	0	3	2	0	0						
7.0906-D	Турция	w	<i>mt2</i>	3	0	3	3	0	0	0					
8.0727-A	Крым	w	<i>mt2</i>	2	0	3	—	—	—	—	0				
8.0727-B	Крым	w	<i>mt1</i>	0	—	0	—	—	2	—	3	—			
8.0228-A		F1	<i>mt1</i>	0	2	0	0	—	3	—	3	—	—		
8.0228-B		F1	<i>mt1</i>	0	3	0	0	—	2	—	3	—	—	—	

Примечание. Бальная шкала обильности воспроизведения: 0 — случаи полового размножения не отмечены; 1 — наблюдаются единичные случаи гаметогенеза/ауксоспорообразования (не отмечены); 2 — случаи гаметогенеза/ауксоспорообразования встречаются часто, но их нельзя назвать массовыми; 3 — наблюдается массовое ауксоспорообразование; "—" — клоны не проверяли на наличие полового воспроизводства; w — клоны, выделенные из природной популяции; F1 — потомки первого поколения; *mt1* и *mt2* — условные типы спаривания; клоны 8.0228-A и 8.0228-B — потомки от скрещивания клонов из разных популяций (7.0525-A и 7.0906-D).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В диатомологии установление видовой принадлежности зачастую представляет собой довольно сложную задачу ввиду ограниченного набора критериев, наличия видовых комплексов и внутривидового варьирования. Исследователи указывают видовую принадлежность, опираясь, как правило, на собственный опыт, а также на имеющиеся в литературе описания и иллюстрации. В большинстве случаев типовое описание вида само по себе не является достаточным для верной идентификации. Вид *Entomoneis paludosa* отмечен во многих районах Мирового океана, иногда значительно удаленных. Места обитания популяций различаются по экологическим характеристикам. Основанная на едином подходе верификация принадлежности всех отмеченных представителей к виду *E. paludosa* не проводилась. Вместе с тем, как показано выше, при сравнении популяций и типового материала (Dalu et al., 2015) могут быть обнаружены определенные морфологические различия.

Сопоставление генетических последовательностей также не дает ответа на вопрос о видовой принадлежности исследуемых клонов. Выделенные нами клоны принадлежат одному кластеру с высокой поддержкой. Эта клада оказалась родственной для *Entomoneis* sp. из Красного моря (штамм SA18 Ento-B1, инвентарный номер GenBank: MN064089.1). Однако другие ранее исследованные клоны *E. paludosa* не объединяются в

единый кластер, а представлены в разных частях построенного филогенетического дерева (см. рис. 2).

Впервые образование ауксоспор у представителя рода *Entomoneis* отмечено в конце XIX века (Karsten, 1899). В соответствии со своей классификацией Карстен отнес половой процесс у *Amphiprora alata* (= *E. alata*) к типу II: в размножении участвуют две материнские клетки, при этом образуются четыре гаметы и две ауксоспоры. К такому же типу Карстен относил половое воспроизведение у *Achnanthes longipes* C. Agardh, *Amphora cymbelloides* Grunow, *Nitzschia hybrida* Grunow и у ряда других диатомей (Karsten, 1899). По системе Карстена половой процесс, характерный для *E. paludosa*, также можно отнести к типу II. Согласно современным представлениям, воспроизведение, при котором в разных гаметах образуются одинаковые по морфологии и поведению гаметы, называется изогамией (Mann, 1993) и можно отнести к категории IC в системе Гейтлера (Geitler, 1973). Такой тип полового процесса ранее описан, например, у *Nitzschia reversa* W. Smith sensu Krammer & Lange-Bertalot (Mann, 1993), *Achnanthes longipes* (Chepurnov, Mann, 1997), *Navicula protracta* Grunow (Mann, 1988) и у ряда других видов шовных диатомей.

Клетки *E. cf. paludosa* приобретают способность воспроизводиться половым путем при апикальной длине 64 мкм, что составляет 50% от максимального видоспецифического размера (128 мкм) и соответствует тенденции, характерной для большинства пеннатных диатомей (Davi-

dovich, 2001). Для сравнения, у бесшовной *Ulnaria ulna* (Nitzsch) Compère этот показатель составляет около 40% от максимального видоспецифического размера (Podunay et al., 2014), у шовных *Haslea karadagensis* Davidovich, Gastineau & Mouget и *Pseudo-nitzschia multiseriis* (Hasle) Hasle – соответственно 54% (Davidovich et al., 2012) и 63% (Bates, Davidovich, 2002).

Гаметы, продуцируемые как женскими, так и мужскими клонами *E. cf. paludosa*, изогамны морфологически (имеют сферическую форму) и поведенчески (не проявляют способности к движению). Полная изогамия характерна также для *Amphora arcus* Gregory (Mann, 1994; Sabbe et al., 2004), *Achnanthes longipes* (Chepurnov, Mann, 1997) и *Haslea ostrearia* (Bory) Simonsen (Davidovich et al., 2009). У представителей рода *Nitzschia* встречается полная изогамия, как, например, у *N. reversa* (Mann, 1993), поведенческая анизогамия при морфологической изогамии, как у *N. recta* Hantzsch ex Rabenh (Mann, 1986), а также сочетание морфологической и поведенческой анизогамии, как у *N. longissima* (Brébisson ex Kützing) Grunow (Davidovich et al., 2006). У планктонных *P. multiseriis* и *P. pseudodelicatissima* (Hasle) Hasle отмечена морфологическая изогамия, однако подвижность гамет, относящихся к клонам разных полов, была разной, что указывает на поведенческую анизогамию (Davidovich, Bates, 1998).

В связи с полной изогамией и неподвижностью гамет, а также из-за специфической формы створки, которая не позволяет гаметангиям приблизиться друг к другу вплотную, у *E. cf. paludosa* возникает проблема доставки гамет к месту сингамии. У гамет *E. cf. paludosa* не отмечено образования псевдоподиальных выростов, характерных для некоторых бесшовных диатомей, таких как *Tabularia fasciculata* (C. Agardh) D.M. Williams & Round, *T. tabulata* (C. Agardh) Snoeijs (Davidovich et al., 2012), *Pseudostaurosira trainorii* E.A. Morales (Sato et al., 2011) и *Ulnaria ulna* (см.: Podunay et al., 2014). Гаметы этой водоросли не обладают амебодным движением, при котором активная пара гамет движется к пассивной, как, например, у представителей *Pseudo-nitzschia* (Davidovich, Bates, 1998).

Для облегчения копуляции гаметы *E. cf. paludosa* после выхода из гаметангиев увеличиваются в размерах в 1.5 раза. Увеличение размера гамет как фактор, способствующий облегчению сингамии, описан у *Schizostauron* Grunow (Davidovich et al., 2017). Вторым механизмом, обеспечивающим сингамию у *E. cf. paludosa*, является сбор гаметангиев в подвижные группы. Поступательное движение клеток группы и их обороты вокруг своей оси облегчают сближение и слияние гамет.

Гаметангии *E. cf. paludosa*, как и гаметангии *Haslea ostrearia* (Davidovich et al., 2009), *Navicula*

*directa* var. *directa* (W. Smith) Ralf in Pritchard (Mizuno, 2000) и ряда других диатомей, при копуляции не образуют заметной слизистой оболочки в отличие, например, от *A. arcus*, вокруг гаметангиальной пары которой видна хорошо развитая слизистая оболочка (Mann, 1994).

Ауксоспоры *E. cf. paludosa* имеют перизониум с хорошо различимыми в световом микроскопе поперечными полосами. Внутри полностью сформировавшегося перизониума откладывается инициальная клетка, створки которой уже имеют характерную для вегетативной клетки форму. Хорошо видимый перизониум формируют многие представители пеннатных диатомей, в том числе каналшовные *Pseudo-nitzschia* (Davidovich, Bates, 1998) и *Nitzschia* (Mann, 1986; Davidovich et al., 2006).

Система скрещивания *E. cf. paludosa* гетероталлическая, ни в одном из исследованных клонов не отмечено случаев гомоталлического воспроизведения. Гетероталлизм характерен для многих диатомей, как шовных, например, *Pinnularia cf. gibba* (Pouličková et al., 2007), так и бесшовных, например, *U. acus* (Kützing) M. Aboal (Подунай и др., 2018). У некоторых видов (*A. longipes*, *N. longissima* и др.) наряду с гетеро- может происходить и гомоталлический половой процесс (Chepurnov, Mann, 1997; Davidovich et al., 2006).

Таким образом, получены данные о половом воспроизведении и жизненном цикле представителя рода *Entomoneis*, важные не только для установления видовых границ с использованием биологического критерия вида, но и для успешного его культивирования и использования в биотехнологии.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках госзадания КНС–ПЗ РАН филиала ФГБУН ФИЦ ИнБЮМ “Изучение фундаментальных физических, физиолого-биохимических, репродуктивных, популяционных и поведенческих характеристик морских гидробионтов”, номер гос. регистрации АААА-А19-119012490045-0; отбор проб на турецком побережье поддержан Программой обмена “TR-YÖK-Proje Tabanlı Değişim Programı” (грант № MEV-2016-46).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Подунай Ю.А., Давидович Н.А., Куликовский М.С., Гусев Е.С. Особенности полового воспроизведения и система скрещивания *Ulnaria acus* (Bacillariophyta) // Журн. Сиб. фед. ун-та. Биология. 2018. С. 1–13.
- Полякова С.Л., Давидович О.И., Подунай Ю.А., Давидович Н.А. Модификация среды ESAW, используемой для культивирования морских диатомовых водорослей // Мор. биол. журн. 2018. Т. 3. № 2. С. 73–80.
- Федин Л.А., Барский И.Я. Микрофотография. Л.: Наука. 1971. 220 с.
- Andersen R.A., Berges J.A., Harrison P.J., Watanabe M.M. Recipes for freshwater and seawater media // Algal culturing techniques. Amsterdam: Elsevier Acad. Press. 2005. P. 429–538.
- Andersen R.A., Kawachi M. Traditional microalgae isolation techniques // Algal culturing techniques. Amsterdam: Elsevier Acad. Press. 2005. P. 83–100.
- Bates S.S., Davidovich N.A. Factors affecting the sexual reproduction of diatoms, with emphasis on *Pseudo-nitzschia* spp. // LIFEHAV: Life histories of microalgal species causing harmful blooms. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities. 2002. P. 31–36. (Research in Enclosed Seas Series; № 12. Eur 20361).
- Chepurnov V.A., Mann D.G. Variation in the sexual behaviour of natural clones of *Achnanthes longipes* (Bacillariophyta) // Eur. J. Phycol. 1997. V. 32. № 2. P. 147–154.
- Clavero E., Grimalt J.O., Hernández–Mariné M. *Entomoneis vertebralis* sp. nov. (Bacillariophyceae); a new species from hypersaline environments // Cryptogam.: Algol. 1999. V. 20. P. 223–234.
- Dalu T., Taylor J.C., Richoux N.B., Froneman W. A re-examination of the type material of *Entomoneis paludosa* (W. Smith) Reimer and its morphology and distribution in African waters // Fottea. 2015. V. 15. P. 11–25.
- Davidovich N.A. Species specific sizes and size range of sexual reproduction in diatoms // Proc. 16th Int. Diatom Symp. (25 Aug.–1 Sept. 2000). Athens: University of Athens. 2001. P. 191–196.
- Davidovich N.A., Bates S.S. Sexual reproduction in the pennate diatoms *Pseudo-nitzschia multiseries* and *P. pseudo-delicatissima* (Bacillariophyceae) // J. Phycol. 1998. V. 34. № 1. P. 126–137.
- Davidovich N.A., Davidovich O.I., Witkowski A. et al. Sexual reproduction in *Schizostauron* (Bacillariophyta) and a preliminary phylogeny of the genus // Phycologia. 2017. V. 56. № 1. P. 77–93.
- Davidovich N.A., Kaczmarek I., Ehrman J.M. The sexual structure of a natural population of the diatom *Nitzschia longissima* (Bréb.) Ralfs // Proc. 18th Int. Diatom Symp. (Miedzyzdroje, Poland. 2–7 September, 2004). Bristol: Biopress Ltd. 2006. P. 27–40.
- Davidovich N.A., Kaczmarek I., Karpov S.A. et al. Mechanism of male gamete motility in araphid pennate diatoms from the genus *Tabularia* (Bacillariophyta) // Protist. 2012. V. 163. № 3. P. 480–494.
- Davidovich N.A., Mouget J.-L., Gaudin P. Heterothallism in the pennate diatom *Haslea ostrearia* (Bacillariophyta) // Eur. J. Phycol. 2009. V. 44. № 2. P. 251–261.
- Edlund M.B., Stoermer E.F. Ecological, evolutionary, and systematic significance of diatom life histories // J. Phycol. 1997. V. 33. P. 897–918.
- Ehrenberg C.G. Neue Untersuchungen über das kleinste Leben als geologisches Moment. Bericht über die zur Bekanntmachung geeigneten Verhandlungen der Königlich-Preussischen Akademie der Wissenschaften zu Berlin. 1845a. P. 53–88.
- Ehrenberg C.G. Vorläufige zweite Mittheilung über die weitere Erkenntnifs der Beziehungen des kleinsten organischen Lebens zu den vulkanischen Massen der Erde. Bericht über die zur Bekanntmachung geeigneten Verhandlungen der Königlich-Preussischen Akademie der Wissenschaften zu Berlin. 1845b. P. 133–157.
- Geitler L. Auxosporenbildung und Systematik bei pennaten Diatomeen und die Cytologie von Cocconeis-Sippen // Österr. Bot. Z. 1973. V. 122. P. 299–321.
- Guiry M.D., Guiry G.M. AlgaeBase. World-wide electronic publication. Nat. Univ. Ireland. Galway. 2020. <http://www.algaebase.org>; searched on 28 May 2020.
- Jauffrais Th., Agogue H., Gemin M. et al. Effect of bacteria on growth and biochemical composition of two benthic diatoms *Halamphora coffeaeformis* and *Entomoneis paludosa* // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2017. V. 495. P. 65–74.
- Karsten G. Die Diatomeen der Kieler Bucht // Wiss. Meeresunters. (Kiel). New Ser. 1899. V. 4. P. 17–205.
- Kudryavtseva V.A., Belevich T.A., Zhitina L.S. Diatoms in the ice of Velikaya Salma strait, the White Sea, before the spring algal bloom // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2017. V. 72. № 2. P. 52–58.
- Kumar S., Stecher G., Li M. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. P. 1547–1549.
- Lange-Bertalot H., Witkowski A., Kulikovskiy M. et al. Taxonomy, frustular morphology and systematics of *Platichthys*, a new genus of canal raphe bearing diatoms within the Entomoneidaceae // Phytotaxa. 2015. V. 236. № 2. P. 135–149.
- Liu B., Williams D.M., Ector L. *Entomoneis triundulata* sp. nov. (Bacillariophyta), a new freshwater diatom species from Dongting Lake, China // Cryptogam.: Algol. 2018. V. 39. № 2. P. 239–253.
- Mann D.G. Methods of sexual reproduction in *Nitzschia*: systematic and evolutionary implications. (Notes for a monograph of the Bacillariaceae) // Diatom Res. 1986. V. 1. № 2. P. 193–203.
- Mann D.G. Sexual reproduction and systematics of *Navicula protracta* // Diatom Res. 1988. V. 3. № 2. P. 227–236.
- Mann D.G. Patterns of sexual reproduction in diatoms // Hydrobiologia. 1993. V. 269/270. P. 11–20.
- Mann D.G. The systematics of amphoroid diatoms: the life history of *Amphora arcus* // Nova Hedwigia. 1994. V. 58. № 3–4. P. 335–352.
- Mann D.G. Size and sex // The diatom world. Dordrecht: Springer. 2011. P. 145–166. (Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology; V. 19. Part 2).
- Mejdandžić M., Bosak S., Orlić S. et al. *Entomoneis tenera* sp. nov., a new marine planktonic diatom (Entomoneidaceae, Bacillariophyta) from the Adriatic Sea // Phytotaxa. 2017. V. 292. P. 1–18.

- Mizuno M. Sexual auxosporulation of the marine diatom *Navicula directa* var. *directa* // *Phycol. Res.* 2000. V. 48. P. 103–106.
- Nguyen-Deroche T.L.N., Caruso A., Trung Le T. et al. Zinc affects differently growth, photosynthesis, antioxidant enzyme activities and phytochelatin synthase expression of four marine diatoms // *Sci. World J.* 2012. V. 2012. Artic. ID 982957.
- Paillès C., Blanc-Valleron M.M., Poulin M. et al. *Entomoneis calixasini* sp. nov., a new fossil diatom from the Turkish Marmara Sea sediments // *Diatom Res.* 2014. V. 29. P. 411–422.
- Podunay Yu.A., Davidovich O.I., Davidovich N.A. Mating system and two types of gametogenesis in the fresh water diatom *Ulnaria ulna* (Bacillariophyta) // *Algologia.* 2014. V. 24. № 1. P. 3–19.
- Pouličková A., Mayama S., Chepurnov V.A., Mann D.G. Heterothallic auxosporulation, incunabula and perizonium in *Pinnularia* (Bacillariophyceae) // *Eur. J. Phycol.* 2007. V. 42. № 4. P. 367–390.
- Poulin M., Daugbjerg N., Gradinger R. et al. The pan-Arctic biodiversity of marine pelagic and sea-ice unicellular eukaryotes: a first-attempt assessment // *Mar. Biodiversity.* 2011. V. 41. P. 13–28.
- Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G. The diatoms. Biology and morphology of the genera. Cambridge: Cambridge Univ. Press. 1990. 747 p.
- Sabbe K., Chepurnov V.A., Mann D.G., Vyverman W. Sexual behaviour, auxosporulation and chloroplast dynamics in a marine *Amphora* (Bacillariophyceae) studied in culture // *Bot. Mar.* 2004. V. 47. № 1. P. 53–63.
- Sato S., Beakes G., Idei M. et al. Novel sex cells and evidence for sex pheromones in diatoms // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 10. e26923.
- Smith W. Synopsis of British Diatomaceae. London: John Van Voorst. 1853. 89 p.

## Sexual Reproduction and Life Cycle of the Pennate Diatom *Entomoneis* cf. *paludosa* (W. Smith) Reimer (Bacillariophyta)

Yu. A. Podunay<sup>a</sup>, N. A. Davidovich<sup>a, b</sup>, O. I. Davidovich<sup>a</sup>, A. Witkowski<sup>b</sup>,  
R. Gastineau<sup>b</sup>, and C. N. Solak<sup>c</sup>

<sup>a</sup>T.I. Vyazemsky Karadag Scientific Station – Nature Reserve of RAS – Branch of A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Feodosia 298188, Russia

<sup>b</sup>Institute of Marine and Environmental Sciences, University of Szczecin, Szczecin 70-383, Poland

<sup>c</sup>Dumlupınar University, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kütahya 43100, Turkey

The sexual reproduction and life cycle of the marine pennate diatom *Entomoneis* cf. *paludosa* have been described for the first time. The sexual process has been found to involve two gametangia, each producing two gametes. This species is characterized by morphological and behavioral isogamy. Its mating system includes the heterothallic mode of reproduction, with no cases of homothallic reproduction recorded. The type of sexual process is close to the category IC in the Geitler's system.

**Keywords:** diatoms, sexual reproduction, life cycle, gamete, auxospore, zygote, *Entomoneis paludosa*

УДК 597.556.331.1(262.5)

## НАХОДКИ ТЕМНОГО ОКУНЯ *SEBASTES SCHLEGELII* HILGENDORF, 1880 В ЧЁРНОМ МОРЕ

© 2021 г. Е. П. Карпова<sup>1, \*</sup>, И. Ю. Тамойкин<sup>2</sup>, В. С. Кулешов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН, Севастополь 299011, Россия

<sup>2</sup>Ассоциация подводной деятельности Крыма и Севастополя, Севастополь 299059, Россия

\*e-mail: karpova\_je@mail.ru

Поступила в редакцию 16.10.2019 г.

После доработки 27.02.2020 г.

Принята к публикации 19.03.2020 г.

В прибрежной зоне Крыма и Кавказа обнаружен представитель тихоокеанской фауны темный окунь *Sebastes schlegelii* Hilgendorf, 1880 – новый вид для Чёрного моря. Первая находка темного окуня состоялась в 2013 г., в настоящее время поимки участились, что с большой долей вероятности указывает на успешное вселение вида. В работе приведены морфологические характеристики черноморских особей и особенности их биотопического распределения. В качестве наиболее вероятных путей вселения *S. schlegelii* указаны случайный занос в ходе работ по акклиматизации гигантской устрицы *Crassostrea gigas* или проникновение с балластными водами судов.

**Ключевые слова:** темный окунь, Чёрное море, вселенец, натурализация

**DOI:** 10.31857/S0134347521010034

Процесс формирования современной ихтиофауны Чёрного моря, начавшийся около 8 тыс. лет назад после последнего присоединения Чёрного моря к Мировому океану, продолжается и в настоящее время. Согласно последним данным, ихтиофауна Чёрного моря насчитывает более 260 видов, в том числе редких морских и пресноводных рыб, известных по единичным находкам (Болтачев, Карпова, 2017). Основное количество новых находок чужеродных видов приходится на прибрежную зону Крыма, где организованы мониторинговые ихтиологические исследования, основанные на подводных наблюдениях с фотофиксацией объектов и на использовании “искусственного биотопа” – приспособления для облова криптобентических видов (Болтачев, Карпова, 2017). Благодаря этим работам 25 видов морских рыб отмечены для региона впервые. Основу натурализовавшихся видов (10) составляют мелкие криптобентические рыбы, ведущие скрытный образ жизни, поэтому установить время их вселения проблематично. Большинство чужеродных видов принадлежит к восточноатлантическому или средиземноморскому ихтиофаунистическим комплексам, 5 видов – к индо-пацифическим видам, к тихоокеанскими эндемикам относятся *Planiliza haematocheila* (Temminck & Schlegel, 1845) и *Tridentiger trigonocephalus* (Gill, 1859). Главной причиной проникновения в Чёрное море аллохтонных видов является естественный процесс ме-

дитерранизации. Однако проникновение чужеродных видов из удаленных районов Мирового океана связано с человеческой деятельностью. Это искусственная (*P. haematocheila*) и случайная (*T. trigonocephalus*) интродукция, непреднамеренный занос с балластными водами судов или выпуск из аквариума, как в случае *Heniochus acuminatus* (Linnaeus, 1758), а также самостоятельное проникновение “мигрантов Лессепса”, например, видов *Sphyræna pinguis* Günther, 1874 и *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789), через Суэцкий канал (Болтачев, Карпова, 2014, 2017).

В связи с этим интересной является находка в Чёрном море у берегов Крыма и Кавказа еще одного тихоокеанского вида – представителя семейства Sebastidae. Цели настоящей работы – описать находки темного окуня *Sebastes schlegelii* Hilgendorf, 1880 и его морфологические характеристики, а также обозначить вероятные пути распространения этого вида и определить современный статус в Чёрном море у берегов Крыма и Кавказа.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для исследования послужили экземпляры рыб, пойманные в районе юго-западного Крыма при помощи промысловых орудий лова (ставной донный невод, жаберные сети). Кроме этого использованы сведения, в том числе

**Таблица 1.** Морфометрические характеристики черноморских экземпляров темного окуня *Sebastes schlegelii*

Признак	Среднее значение	Минимум	Максимум
<i>TL</i> , мм	350.7	325.2	390.5
<i>SL</i> , мм	297.5	276.5	331.0
<i>W</i> , мм	918.5	710.0	1151.2
	(% от <i>SL</i> )		
Наибольшая высота тела	35.1	33.7	36.4
Высота хвостового стебля	10.3	10.2	10.5
Наибольшая ширина тела	22.5	21.2	23.8
Ширина хвостового стебля	4.1	3.8	4.5
Преддорсальное расстояние	34.4	33.0	35.8
Постдорсальное расстояние	12.8	12.5	13.1
Антевентральное расстояние	38.1	37.4	38.9
Антеанальное расстояние	68.4	67.8	69.2
Антепекторальное расстояние	34.6	33.6	35.5
Пектоцентрального расстояние	4.8	4.7	5.2
Вентроанальное расстояние	24.4	18.8	30.2
Длина спинного плавника	62.6	62.5	62.7
Длина анального плавника	15.9	15.5	16.4
Длина грудного плавника	22.2	21.2	22.9
Длина брюшного плавника	20.4	20.3	20.6
Длина хвостового плавника	21.1	21.1	21.2
Длина головы	37.8	35.5	40.1
	(% от длины головы)		
Высота головы у затылка	74.0	73.1	74.6
Длина рыла	30.7	29.7	32.0
Длина верхней челюсти	48.3	47.2	49.4
Длина нижней челюсти	54.7	54.3	55.2
Диаметр глаза	19.6	18.3	21.1
Посторбитальное расстояние	52.3	52.2	52.5

фотографии добытых особей, полученные с помощью Межрегиональной общественной организации “Ассоциация подводной деятельности Крыма и Севастополя” (АПДКС) в российском секторе Чёрного моря.

Данные морфометрического и неполного биологического анализа пойманных экземпляров рыб (табл. 1) приведены в соответствии с общепринятыми методиками (Правдин, 1966).

### РЕЗУЛЬТАТЫ

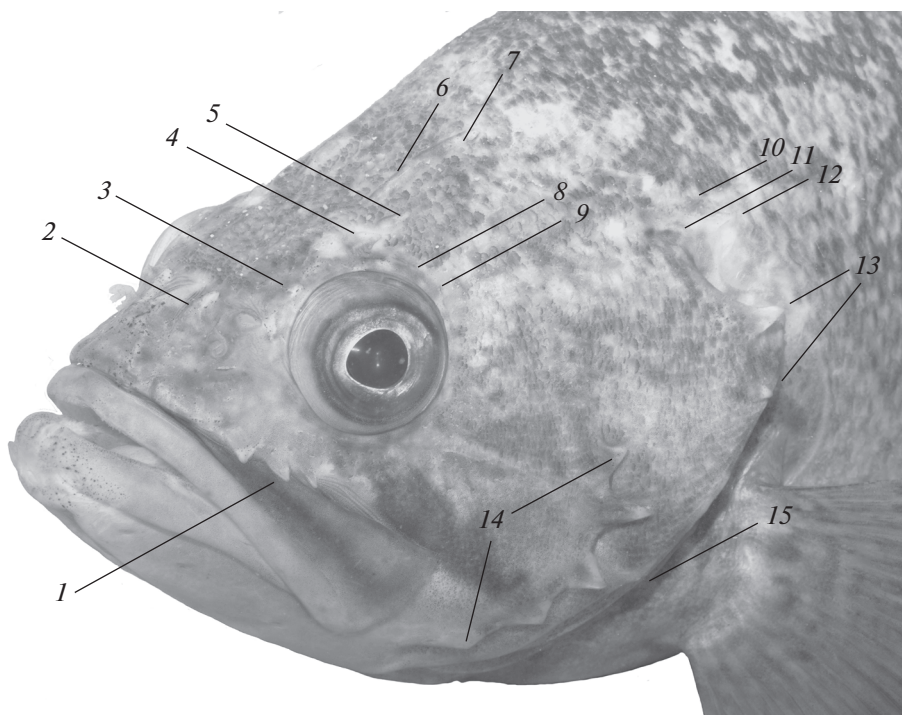
Впервые представитель семейства Sebastidae в Чёрном море был обнаружен 26 мая 2013 г. в прибрежной зоне юго-западного Крыма в районе мыса Айя (44°29'16.80" N; 33°36'54.39" E) в улове промысловой донной ловушки, установленной на глубине около 40 м. Рыба, доставленная в живом виде в Севастопольский аквариум, вначале

была определена как зубатый группер *Epinephelus caninus* Valenciennes, 1834 (см.: Болтачев и др., 2013; Boltachev, Karpova, 2013). В дальнейшем экземпляр под № АВ-1503 был передан на хранение в коллекцию Института биологии южных морей им. О.А. Ковалевского РАН.

Второй экземпляр был пойман 14 апреля 2019 г. в районе пос. Кача у западного побережья Крыма (44°45'32.9" N; 33°32'18.2" E) в ночное время на удалении около 30 м от берега на глубине 3–4 м при температуре воды 12°C. Рыба попала в жаберную сеть с ячейей 36 мм, располагавшуюся перпендикулярно берегу на галечно-песчаном дне между характерными для этого участка побережья выходами песчаника с навалами камней.

Одна особь обнаружена 29 мая 2019 г. в улове донной ловушки недалеко от г. Балаклава (44°29'24.8" N; 33°34'27.9" E) на глубине около 15 м. Информация о поимке двух рыб, подтвержден-





**Рис. 1.** Расположение шипов на голове темного окуня *Sebastes schlegelii*, пойманного в районе Балаклавы (Чёрное море): 1 – лакримальные, 2 – носовые, 3 – предглазничные, 4 – заглазничные, 5 – тимпанальные, 6 – затылочные, 7 – нухальные, 8 – сфенотикальные, 9 – посторбитальные, 10 – верхние посттемпоральные, 11 – нижние посттемпоральные, 12 – супраклейтральные, 13 – оперкулярные, 14 – преоперкулярные, 15 – субоперкулярные.

ная их фотографиями, получена при опросе рыболовов-любителей и подводных охотников, проведенном АПДКС в мае–августе 2019 г. В районе мыса Меганом (44°48′02.6″ N; 35°02′44.8″ E) одна рыба была выловлена 22 июля 2019 г. на дне с преобладающим каменистым грунтом на глубине 14 м при высокой мутности воды, умеренном течении и температуре около 22–24°C в дневное время; еще один экземпляр пойман в июле этого же года в районе мыса Большой Утриш (44°45′54.5″ N; 37°22′57.5″ E), где также расположены каменистые биотопы. Соленость воды в районах поимки рыб соответствовала обычной черноморской (около 18‰); температура воды в летний период не превышала 26°C, а в зимний не опускалась ниже 4°C.

Сравнение рыб, пойманных в 2019 г., и экземпляра, обнаруженного в 2013 г., показало, что они идентичны. Принадлежность всех особей к семейству морских окуней *Sebastidae* установлена на основании наличия гребней и шипов на голове (рис. 1). В отличие от атлантических видов окуней-себастесов, у которых 15 колючих лучей в спинном плавнике, красноватое тело и один или два лакримальных шипа (Барсуков, 1972, 2003; Ishida 1995), обнаруженные особи имели 13 колючих лучей, 3 лакримальных шипа и серую окраску.

Все пойманные у берегов Крыма и Кавказа рыбы определены как темный окунь *Sebastes schlegelii* Hilgendorf, 1880 на основании следующих диагностических признаков. Тело рыб, бока и верх головы вплоть до вершины рыла покрыты ктеноидной чешуей. Плавательный пузырь имеется. Межглазничное пространство слегка выпуклое, верхнечерепные гребни и шипы сравнительно слабые. Лакримальные шипы 3, надглазничные шипы отсутствуют (рис. 1). Рот косо направлен вверх, нижняя челюсть выдается, передние зубы нижней челюсти не выступают вперед. Верхняя и нижняя губы темно-серые, без поперечных полос. На предкрышке 5 шипов. В спинном плавнике 13 колючих, в анальном плавнике 7 ветвистых лучей. В области ветвистых лучей, которых насчитывается 18, контур грудного плавника округлый. В боковой линии 47–49 пор. Окраска темно-серая с мраморным рисунком из мелких неясных более темных пятен (рис. 2а); в стрессовом состоянии окраска меняется на светло-серую, при этом средняя часть нижней губы и верхняя часть рыла чернеют (рис. 2б).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В семействе *Sebastidae* (отряд *Scorpaeniformes*) род *Sebastes* самый богатый видами, он включает около 115 представителей по всему миру (Барсу-



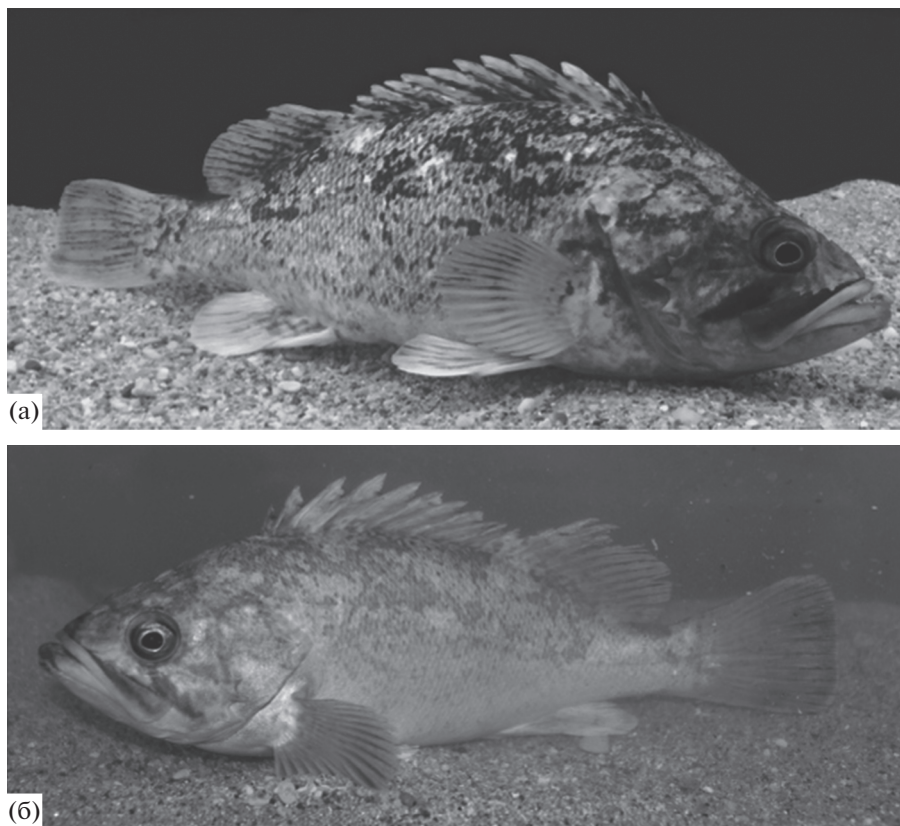


Рис. 2. Окраска темного окуня *Sebastes schlegelii* в обычном (а) и стрессовом (б) состояниях.

ков, 2003). Наиболее разнообразны морские окуни в северной части Тихого океана (Kai et al., 2003; Hyde, Vetter, 2007). В Атлантическом океане встречается только 6 видов: *S. capensis* (Gmelin, 1789) и *S. oculatus* Valenciennes, 1833 обитают в его южной части, а *S. fasciatus* Storer, 1854; *S. mentella* Travin, 1951; *S. norvegicus* (Ascanius, 1772) и *S. viviparus* Krøyer, 1845 – в северной. В Средиземном море представители данного рода не отмечены.

Темный окунь – низкобореальный приазиатский вид. Обитает в Жёлтом море у побережья Китая (к северу от провинции Шаньдун) и Корейского полуострова, в Корейском проливе, в Восточно-Китайском море у о-ва Кюсю; в Японском море встречается вдоль всего побережья Японии и у юго-западного побережья о-ва Сахалин (до г. Холмск), а также у материкового побережья от Корейского полуострова до Советской Гавани; в южной части Охотского моря у берегов северного Хоккайдо и юго-восточного побережья о-ва Сахалин. Северная граница распространения *S. schlegelii* находится у Курильских островов Итуруп и Кунашир (Линдберг, Красюкова, 1987; Снытко, 2001; Барсуков, 2003; Yamada et al., 2007). В данном регионе это один из самых обычных видов. В пределах нативного ареала темный окунь обычно держится на шельфе, иногда на верхней

части склона на глубине от 3 до 420 м (Снытко, 2001). Он относится к живородящим рыбам с длительной пелагической личиночной стадией, длящейся около года. После вымета личинки держатся в хорошо освещенных верхних слоях воды. Личинки и мальки прячутся в плавающих на поверхности воды пучках водорослей, у бревен, буйков и других предметов или собираются в плотные шарообразные скопления. По мере роста молодь все больше тяготеет ко дну, но держится ближе к берегу и на меньших, чем половозрелые особи, глубинах (Hatanaka, Iizuka, 1962a, 1962b, 1962c; Линдберг, Красюкова, 1987; Safran, 1990; Снытко, 2001). Таким образом, вид относится к оседлым рыбам, что исключает его самостоятельную миграцию в районы, близкие к Чёрному морю.

Вне пределов нативного ареала известна находка одного экземпляра темного окуня в 2008 г. в Северном море у берегов Нидерландов (Kai, Soes, 2009). Наиболее вероятными путями проникновения пойманного экземпляра в этот район авторы сообщения указали ввоз для аквариумного содержания с последующим выпуском в естественную среду или пассивную транспортировку в танках судов с балластными водами.

Для предотвращения снижения численности темного окуня, что обусловлено деградацией сре-

ды обитания и чрезмерным выловом, в провинции Шаньдун (Жёлтое море, Китай) с 2007 г. реализован ряд программ по увеличению запасов этого вида (Lü et al., 2014a, 2014b). В течение нескольких лет в прибрежных водах г. Яньтай ежегодно выпускали более 1.5 млн. мальков (Xi et al., 2017). Плотность скоплений мальков могла быть достаточно высокой, чтобы способствовать их распространению с балластными водами судов из Китая. Однако достичь средиземноморских или черноморских портов этот вид мог лишь в том случае, если условия существования в балластных танках были приемлемыми для длительного (несколько недель) пребывания в них молоди. Повторяющиеся на протяжении ряда лет находки разноразмерных особей темного окуня могут свидетельствовать о натурализации вида в Чёрном море, а не о проникновении единичных экземпляров. Известный случай о вселении вида в результате выпуска из аквариума (Болтачев, Карпова, 2014) можно считать уникальным, связанным с несколькими факторами, в частности, с одновременным выпуском достаточно большого количества половозрелых экземпляров и с небольшими размерами вида. Крупные рыбы, такие как темный окунь, не содержатся в аквариуме в большом количестве, поэтому выпуск достаточно большого числа рыб вряд ли мог быть случайным и незамеченным, а целенаправленный выпуск маловероятен.

Мы предполагаем, что молодь темного окуня могла проникнуть в новое и удаленное местообитание вместе с гигантской устрицей *Crassostrea gigas*, партии которой неоднократно доставляли в районы южного побережья Крыма и мыса Большой Утриш для её акклиматизации у берегов Крыма и Кавказа (Золотницкий и др., 2008). На протяжении более чем 20 лет предприниматели неоднократно пытались организовать здесь устричные морские хозяйства, при этом посадочный материал ввозили разными способами, часто без соблюдения карантинных мероприятий. В результате этой деятельности, вероятно, произошло вселение темного окуня в Чёрное море и образовалась сравнительно немногочисленная самовоспроизводящаяся популяция данного вида.

По экологическим особенностям темный окунь в Чёрном море может составить конкуренцию местному виду – скорпене *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758, однако в настоящее время не наблюдается какого-либо влияния вида-вселенца на прибрежные экосистемы, возможно, из-за его малочисленности. В популяциях местных рыб также не отмечены изменения, которые можно связать с появлением темного окуня. Потенциально этот вид может представлять интерес как объект марикультуры.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследования выполнены в рамках программ ФИЦ ИнБЮМ государственного задания на 2018–2020 гг. по теме “Закономерности формирования и антропогенная трансформация биоразнообразия и биоресурсов Азово-Черноморского бассейна и других районов Мирового океана” (№ АААА-А18-118020890074-2) и частично в рамках гранта РФФИ “Динамика и последствия интродукции чужеродных видов рыб и беспозвоночных в биоценозы прибрежной зоны и бухт Севастополя” (№ гос. регистрации 18-44-920016).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность рыбаку С. Соколу и подводному охотнику А.И. Семенову за предоставленные экземпляры темного окуня, а также рыбаку-любителю Б.Н. Корсаеву и активистам АПДКС за документально подтвержденные сведения о поимках темного окуня у берегов Крыма и Кавказа.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Барсуков В.В. Систематика атлантических морских окуней // Тр. ПИНРО. 1972. Вып. 28. С. 128–142.
- Барсуков В.В. Аннотированный и иллюстрированный каталог морских окуней Мирового океана // Тр. ЗИН РАН. 2003. Т. 295. 319 с.
- Болтачев А.Р., Карпова Е.П. Фаунистическая ревизия чужеродных видов рыб в Черном море // Рос. журн. биол. инвазий. 2014. № 3. С. 2–25.
- Болтачев А.Р., Карпова Е.П. Морские рыбы Крымского полуострова. 2-е изд. Симферополь: Бизнес-Информ. 2017. 376 с.
- Болтачев А.Р., Карпова Е.П., Бродский С.Н., Кирилин М.П. Первая регистрация зубатого групера *Epinephelus caninus* (Osteichthyes, Serranidae) в Черном море // Мор. экол. журн. 2013. Т. 12. № 3. С. 22.
- Золотницкий А.П., Орленко А.Н., Крючков В.Г., Сьтник Н.А. К вопросу организации крупномасштабного культивирования устриц в озере Донузлав // Тр. ЮгНИРО. 2008. Т. 46. С. 48–54.
- Линдберг Г.У., Красюкова З.В. Рыбы Японского моря и сопредельных частей Охотского и Жёлтого морей. Л.: Наука. 1987. Ч. 5. 526 с.
- Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб. М.: Пищ. пром-сть. 1966. 376 с.
- Сьтничко В.А. Морские окуни северной части Тихого океана. Владивосток: ТИНРО-центр. 2001. 468 с.

- Boltachev A., Karpova E.* First record of dogtooth grouper *Epinephelus caninus* (Valenciennes, 1834), Perciformes, Serranidae, in the Black Sea // *BioInvasions Records*. 2013. V. 2. № 3. P. 257–261.
- Hatanaka M., Iizuka K.* Studies on the fish community of the *Zostera* area – I. The ecological order for feeding in the fish group related to the dominant species // *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 1962a. № 28. P. 5–16.
- Hatanaka M., Iizuka K.* Studies on the fish community of the *Zostera* area – II. Trophic order in a fish group living outside of the *Zostera* // *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 1962b. № 28. P. 155–161.
- Hatanaka M., Iizuka K.* Studies on the fish community of the *Zostera* area – III. Efficiency of production of *Sebastes inermis* // *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 1962c. № 28. P. 305–313.
- Hyde J.R., Vetter R.D.* The origin, evolution, and diversification of rockfishes of the genus *Sebastes* (Cuvier) // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2007. № 44 (2). P. 790–811.
- Ishida M.* Scorpaenidae // *Fishes Collected by R/V Shinkai Maru Around Greenland*. Tokyo: Japan Marine Resources Research Center. 1995. P. 151–152, 160.
- Kai Y., Nakayama K., Nakabo T.* Molecular phylogenetic perspective on speciation in the genus *Sebastes* (Scorpaenidae) from the Northwest Pacific and the position of *Sebastes* within the subfamily Sebastinae // *Ichthyol. Res.* 2003. № 50. P. 239–244.
- Kai Y., Soes D.M.* A record of *Sebastes schlegelii* Hilgendorf, 1880 from Dutch coastal waters // *Aquat. Invasions*. 2009. V. 4. № 2. P. 417–419. <https://doi.org/10.3391/ai.2009.4.2.23>
- Lü H., Zhang X., Xi D., Gao T.* Use of calcein and alizarin red S for immersion marking of black rockfish *Sebastes schlegelii* juveniles // *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 2014a. V. 32. P. 88–98.
- Lü H., Zhang X., Fu M. et al.* Use of tetracycline hydrochloride and alizarin complexone for immersion marking black rockfish *Sebastes schlegelii* // *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 2014b. V. 32. P. 810–820.
- Safran P.* Drifting seaweed and associated ichthyofauna: floating nursery in Tohoku waters // *La Mer.* 1990. V. 28. № 4. P. 225–239.
- Xi D., Zhang X., Lü H., Zhang Z.* Cannibalism in juvenile black rockfish, *Sebastes schlegelii* (Hilgendorf, 1880), reared under controlled conditions // *Aquaculture*. 2017. № 479. P. 682–689. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.07.007>
- Yamada U., Tokimura M., Horikawa H., Nakabo T.* Fishes and Fisheries of the East China and Yellow Seas. Tokyo: Tokai Univ. Press. 2007.

## Findings of the Korean Rockfish *Sebastes schlegelii* Hilgendorf, 1880 in the Black Sea

E. P. Karpova<sup>a</sup>, I. Yu. Tamoykin<sup>b</sup>, and V. S. Kuleshov<sup>b</sup>

<sup>a</sup>A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol 299011, Russia

<sup>b</sup>Crimean and Sevastopol Underwater Association, Sevastopol 299059, Russia

A new species for the Black Sea – the Korean (dark) rockfish *Sebastes schlegelii* Hilgendorf, 1880, a representative of the Far Eastern fauna – was found in the coastal zone of the Crimea and the Caucasus. The first find of the Korean rockfish took place in 2013; presently the findings of this species have become more frequent; which suggests its successful introduction. The paper presents the detailed morphological characteristics of the Black Sea individuals and the features of their biotopic distribution. Random introduction of *Sebastes schlegelii* with ship ballast waters or during acclimatization of the giant oyster *Crassostrea gigas* is assumed to be the most probable result of the appearance of the species in the Black Sea.

*Keywords:* Korean rockfish, dark rockfish, Black Sea, alien species, naturalization

УДК 582.272:632.4.01/.08:57.022:543.9

## ТОКСИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ МИКРОМИЦЕТОВ В БУРЫХ ВОДОРОСЛЯХ СЕМЕЙСТВ FUCACEAE И LAMINARIACEAE ИЗ БЕЛОГО МОРЯ

© 2021 г. А. А. Буркин<sup>1</sup>, Г. П. Кононенко<sup>1,\*</sup>, А. А. Георгиев<sup>2</sup>, М. Л. Георгиева<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.П. Коваленко, Москва 123022, Россия

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва 119234, Россия

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва 119021, Россия

\*e-mail: kononenkogrp@mail.ru

Поступила в редакцию 08.11.2019 г.

После доработки 05.02.2020 г.

Принята к публикации 24.09.2020 г.

В бурых водорослях *Ascophyllum nodosum*, *Pelvetia canaliculata*, *Fucus vesiculosus*, *Laminaria digitata* и *Saccharina latissima* из Кандалакшского залива Белого моря с помощью иммуноферментного анализа проведен поиск низкомолекулярных метаболитов, известных как микотоксины микромицетов родов *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus* и др. В талломах *A. nodosum*, и *F. vesiculosus* выявлены Т-2 токсин, диацетоксисцирпенол, дезоксиниваленол, зеараленон, фумонизины группы В, альтернариол, охратоксин А, цитринин, PR-токсин, микофеноловая кислота, афлатоксин В<sub>1</sub>, стеригматоцистин, циклопиазоновая кислота, эмодин, роридин А и эргоалкалоиды. Показано, что в *F. vesiculosus* присутствуют почти все перечисленные токсины в значительном количестве. *P. canaliculata* уступает *A. nodosum* по содержанию PR-токсина, микофеноловой кислоты, эмодина и роридина А, содержание остальных веществ существенно не различается. У *L. digitata* и *S. latissima* анализируемые микотоксины не обнаружены, за исключением следовых количеств эргоалкалоидов.

**Ключевые слова:** макроводоросли, *Fucus*, *Ascophyllum*, *Pelvetia*, *Laminaria*, *Saccharina*, микотоксины, иммуноферментный анализ

DOI: 10.31857/S0134347521010022

Грибы способны продуцировать многообразие вторичных метаболитов, представляющих собой вещества с низкой молекулярной массой, среди которых особый интерес представляет группа микотоксинов. Природная роль этих веществ, распространение, факторы и условия окружающей среды, влияющие на их синтез, — активно развивающаяся область исследований. Значительный прогресс в изучении ассоциативных связей микромицетов с другими организмами во многом достигнут благодаря уникальным возможностям скринингового анализа вторичных метаболитов. В лишайниках и травянистых растениях с помощью унифицированного подхода на основе иммуноферментного анализа (ИФА) обнаружены микотоксины, свойственные грибам из родов *Fusarium* Link, *Alternaria* Nees, *Penicillium* Link, *Aspergillus* P. Micheli ex Haller и др., и выявлен так называемый метаболический профиль — соотношение их качественного состава и количественного содержания (Буркин, Кононенко, 2013; Кононен-

ко, Буркин, 2019). Грибы данной таксономической принадлежности, обычные для морских биотопов (Höller et al., 2000; Park et al., 2014; Киричук, Пивкин, 2015; Raghukumar, 2017), обладают способностью к биосинтезу разных структурных типов токсичных веществ, в том числе биосинтетических предшественников и аналогов известных микотоксинов (Jiang et al., 2002; Nicoletti, Trincone, 2016; Zhang et al., 2016). Отечественные исследователи подтвердили присутствие потенциально токсигенных видов *Alternaria*, *Penicillium* и *Aspergillus* в микобиоте массовых видов бурых водорослей семейств Fucaceae и Laminariaceae из прибрежной зоны Белого моря (Бубнова, Киреев, 2009; Коновалова, Бубнова, 2011), однако поиск микотоксинов в этих макрофитах не проводился. Цель настоящей работы — изучение встречаемости токсичных метаболитов, синтезируемых микромицетами родов *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus* и др., в бурых водорослях из семейств Fucaceae и Laminariaceae.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектами исследования были бурые водоросли *Fucus vesiculosus* Linnaeus, *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis и *Pelvetia canaliculata* (Linnaeus) Decaisne & Thuret (семейство Fucaceae), а также *Laminaria digitata* (Hudson) J.V. Lamouroux и *Saccharina latissima* (Linnaeus) C.E. Lane, C. Mayes, Druehl & G.W. Saunders (семейство Laminariaceae). Талломы водорослей отбирали 8–9 мая 2019 г. в Кандалакшском заливе Белого моря на северном берегу о-ва Кривой (66°30' N, 33°08' E) в типичных местообитаниях данных видов. *A. nodosum* (6 талломов) и *F. vesiculosus* (9 талломов) отбирали в средней и нижней литорали, *P. canaliculata* (5 талломов) – в верхней зоне литорали и супралиторали. В сублиторали отбирали *L. digitata* (5 талломов) и *S. latissima* (5 талломов), у которых отделяли стволик (многолетнюю часть) и три фрагмента пластины: основание (зону роста), середину и дистальную часть. У трех талломов *S. latissima* дистальную часть прошлогодней и сильно обросшей пластины делили на старый и отмирающий фрагменты.

В течение 1–2 ч после сбора образцы водорослей сушили в токе воздуха при температуре 60°C и транспортировали, сохраняя в суховоздушном состоянии; затем их измельчали в лабораторной мельнице. Для экстракции применяли смесь ацетонитрила и воды в объемном соотношении 84 : 16 при расходе 10 мл на 1 г навески. Экстракты после 10-кратного разбавления буферным раствором использовали в непрямом конкурентном ИФА. Микотоксины – Т-2 токсин (Т-2), диацетоксисцирпенол (ДАС), дезоксиниваленол (ДОН), зеараленон (ЗЕН), фумонизины (ФУМ), альтернариол (АОЛ), охратоксин А (ОА), цитринин (ЦИТ), афлатоксин В<sub>1</sub> (АВ<sub>1</sub>), стеригматоцистин (СТЕ), циклопиазоновую кислоту (ЦПК), микрофеноловую кислоту (МФК), PR-токсин (PR), эмодин (ЭМО), роридин А (РОА) и эргоалкалоиды (ЭА) анализировали с помощью аттестованных иммуноферментных тест-систем (Кононенко, Буркин, 2018, 2019). Нижний предел количественных измерений соответствовал 85% уровню связывания антител.

Данные обсчитывали в программе Microsoft Office Excel и представляли в виде среднего арифметического значения  $M$  и ошибки выборочной средней  $\pm SEM$ ; для статистической обработки использовали непараметрический суммарный непарный критерий Вилкоксона в программе R version 3.4.3 (McDonald, 2014).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В талломах двух видов семейства Laminariaceae *L. digitata* и *S. latissima* микотоксины не обнаружены, за исключением следовых количеств ЭА (от 2

до 8 нг/г), которые были найдены в зонах роста и в средних частях пластин. В то же время во всех трех видах семейства Fucaceae – *A. nodosum*, *P. canaliculata* и *F. vesiculosus* – присутствовал полный набор искомым метаболитов (табл. 1). По интенсивности накопления четко прослеживались ряды: для фузариотоксинов – ДАС > ДОН > ФУМ > ЗЕН > Т-2, для токсинов грибов *Aspergillus* и *Penicillium* – PR, МФК, ЦПК > ЦИТ, ОА, СТЕ > АВ<sub>1</sub>. Отдельные виды водорослей не различались по содержанию Т-2, ЦИТ и СТЕ, а в отношении остальных метаболитов этой группы наблюдались признаки как сходства, так и различия. У *F. vesiculosus* содержание метаболитов было достоверно выше, чем у двух других видов семейства. *A. nodosum* отличался от *P. canaliculata* лишь более выраженным накоплением PR и МФК при сходстве или незначимых колебаниях содержания остальных компонентов. Содержание ЭМО и РОА у всех трех видов макрофитов существенно различалось. Сверхвысокие уровни накопления – более 10 тыс. нг/г – определены для ДАС (у всех трех видов), PR (у *A. nodosum* и *F. vesiculosus*) и ЭА (у *F. vesiculosus*).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полный набор анализируемых микотоксинов у водорослей семейства Fucaceae указывает на существование в этих макрофитах комплекса биосинтетических путей, известных для отдельных видов микроскопических грибов. *F. vesiculosus* практически по всем компонентам отличался большей интенсивностью метаболического профиля, чем *A. nodosum* и *P. canaliculata*, которые обильно ассоциированы с эндофитным аскомицетом *Stigmatium ascophylli* (Cotton) Aptroot (см.: Коновалова и др., 2012). Учитывая возможность влияния микобионта на биохимическую систему организма-хозяина, снижение интенсивности накопления метаболитов без изменения компонентного состава можно объяснить некоторым эффектом сдерживания метаболических процессов без блокирования или стимулирования отдельных реакций.

Различия в накоплении двух фузариогенных трихотец-9-енов (ДАС и Т-2) у водорослей оказались весьма значительными. Возможно, в этих организмах условия обитания продуцирующего гриба или группы грибов в большей мере способствуют реализации биосинтеза ДАС. Больше количество ДАС, чем Т-2, отмечено ранее у травянистых растений, что рассматривалось как редкая аномалия (Кононенко et al., 2015). При изучении макрофитов Белого моря из внутренней части талломов *A. nodosum* и *P. canaliculata* получены единичные изоляты рода *Fusarium* неустановленной видовой принадлежности (Коновалова, Бубнова, 2011), однако у *F. vesiculosus*, в котором со-

**Таблица 1.** Содержание микотоксинов в талломах бурых водорослей *Pelvetia canaliculata*, *Ascophyllum nodosum* и *Fucus vesiculosus*

Метаболит	Содержание микотоксина, нг/г, $M \pm SEM$		
	<i>P. canaliculata</i> (n = 5)	<i>A. nodosum</i> (n = 6)	<i>F. vesiculosus</i> (n = 9)
Т-2	34 ± 2 <sup>a</sup>	29 ± 2 <sup>a</sup>	37 ± 6 <sup>a</sup>
ДАС	13520 ± 717 <sup>ab</sup>	12200 ± 821 <sup>a</sup>	22860 ± 3135 <sup>b</sup>
ДОН	1740 ± 54 <sup>a</sup>	1660 ± 195 <sup>a</sup>	4490 ± 859 <sup>b</sup>
ЗЕН	165 ± 15 <sup>a</sup>	175 ± 13 <sup>a</sup>	510 ± 98 <sup>b</sup>
ФУМ	790 ± 79 <sup>a</sup>	765 ± 67 <sup>a</sup>	1700 ± 225 <sup>b</sup>
АОЛ	255 ± 13 <sup>a</sup>	265 ± 16 <sup>a</sup>	1040 ± 245 <sup>b</sup>
ОА	130 ± 9 <sup>a</sup>	115 ± 18 <sup>a</sup>	505 ± 82 <sup>b</sup>
ЦИТ	450 ± 27 <sup>a</sup>	750 ± 118 <sup>a</sup>	630 ± 73 <sup>a</sup>
АВ <sub>1</sub>	71 ± 8 <sup>a</sup>	125 ± 17 <sup>ab</sup>	160 ± 35 <sup>b</sup>
СТЕ	355 ± 12 <sup>a</sup>	390 ± 19 <sup>a</sup>	510 ± 60 <sup>a</sup>
ЦПК	1080 ± 52 <sup>a</sup>	2165 ± 354 <sup>b</sup>	1910 ± 279 <sup>ab</sup>
PR	4660 ± 521 <sup>a</sup>	13540 ± 1486 <sup>b</sup>	21700 ± 1676 <sup>c</sup>
МФК	2460 ± 170 <sup>a</sup>	4460 ± 454 <sup>b</sup>	2945 ± 390 <sup>a</sup>
ЭМО	91 ± 8 <sup>a</sup>	240 ± 40 <sup>b</sup>	1075 ± 357 <sup>c</sup>
РОА	52 ± 4 <sup>a</sup>	180 ± 29 <sup>b</sup>	540 ± 54 <sup>c</sup>
ЭА	255 ± 50 <sup>a</sup>	930 ± 293 <sup>a</sup>	16560 ± 2944 <sup>b</sup>

Примечание. Надстрочные латинские буквы указывают на значимость различий при  $p < 0.05$ . Значения считаются достоверно различными при отсутствии совпадающих букв. Расшифровка сокращенных названий метаболитов приведена в главе “Материал и методика”.

держание всех анализированных фузариотоксинов было значительно выше, представители этого рода не найдены (Бубнова, Киреев, 2009).

Содержание АОЛ в талломах фукуса было выше, чем в талломах аскофиллума и пельвеции (табл. 1), а один из потенциальных продуцентов этого микотоксина – *Alternaria alternata* (Fr.) Keisler, был отмечен в составе микобиоты на талломах первых двух видов водорослей (Бубнова, Киреев, 2009; Коновалова, Бубнова, 2011).

По данным микологического анализа, грибы из родов *Penicillium* и *Aspergillus* были достаточно широко представлены в живых талломах исследованных макрофитов как по распространенности, так и по видовому разнообразию, среди них *P. brevicompactum* Dierckx, *P. chrysogenum* Thom и *A. versicolor* (Vuill.) Tirab. (см.: Бубнова, Киреев, 2009; Коновалова, Бубнова, 2011) – известные продуценты МФК, PR (Frisvad et al., 2004) и СТЕ (Cole, Cox, 1981). В перечень обнаруженных нами токсинов этих грибов входили также ОА, ЦИТ, АВ<sub>1</sub> и ЦПК.

Наблюдаемая стабильность содержания ЦИТ и СТЕ, биосинтетических предшественников ОА и АВ<sub>1</sub>, с одной стороны, и межвидовое варьирование количеств конечных продуктов биосинтеза – с другой, свидетельствуют о том, что продуцентами каждого метаболита могут быть разные микроми-

цеты. Известное для отдельных видов *Penicillium* и *Aspergillus* совмещение биосинтеза МФК и PR, а также АВ<sub>1</sub> и ЦПК представляется маловероятным из-за несовпадающей направленности изменения их содержания от одного макрофита к другому.

Крайне высокое содержание ДАС (более 10 тыс. нг/г) выявлено у всех трех видов фукусных водорослей, обнаружены также высокие значения PR у аскофиллума и фукуса. У обитающих на суше лишайников и высших сосудистых растений содержание этих токсинов было гораздо ниже. Так, верхние пределы концентраций ДАС и PR в лишайнике гипогимния вздутая были на порядок ниже (Буркин, Кононенко, 2013), как и в луговых травах (клевере луговом, чине луговой), содержание ДАС в которых достигало лишь тысяч нг/г (Кононенко, Буркин, 2018, 2019).

Содержание антрахинона ЭМО и макроциклического трихотецена РОА у водорослей разных видов достоверно различалось, но в целом было умеренным и варьировало от десятков до сотен и тысяч нг/г. Для сравнения, у лишайников рода ксантория содержание ЭМО достигало 100 тыс. нг/г, а РОА обнаружен только в следовых количествах в единичных образцах гипогимнии вздутой (Буркин, Кононенко, 2013). Причины столь значительных различий содержания ЭМО и РОА в био-

объектах остаются неясными из-за дискуссии о путях их биогенеза (Izhaki, 2002).

Сверхвысокую концентрацию ЭА у *F. vesiculosus*, на порядок превышающую таковую у *P. canaliculata* и *A. nodosum*, можно считать неожиданным научным фактом. Сравнимые уровни контаминации известны для культурных и дикорастущих злаков, пораженных агрессивной G3 линией эпифитного гриба *Claviceps purpurea* (Fries) Tulasne, а также для луговых и сеянных трав, заселенных высоко токсигенными специфическими эндофитами (Gerhards et al., 2014). Наличие специфической эндофитной микобиоты подтверждено как для ламинариевых, так и для некоторых фукусовых водорослей (Flewelling et al., 2013). Эндофитный гриб *S. ascophylli* был выявлен во всех частях талломов беломорских макрофитов *P. canaliculata* и *A. nodosum* (см.: Коновалова, Бубнова, 2011; Коновалова и др., 2012), поэтому его способность продуцировать ЭА представляет несомненный интерес.

В последние годы серьезную обеспокоенность исследователей вызывает появление новых природных зон с высокой контаминацией биообъектов эргоалкалоидами. Обширное распространение в Ваттовом море солероса *Spartina anglica* С.Е. Hubbard, интенсивно пораженного *Claviceps purpurea* var. *spartinae*, и возможность длительной миграции его склероциев линии G3 в морской воде несут реальную угрозу для пастбищных животных на прибрежных территориях европейских стран (Boestfleisch et al., 2015). Следует отметить, что в склероциях спорыньи, интенсивно заселяющей низкорослые злаковые травы на побережье Белого моря, содержание ЭА достигает таких же критических значений (наши неопубликованные данные).

У видов *L. digitata* и *S. latissima* из семейства Laminariaceae микотоксины не обнаружены. Полученная информация представляет особую ценность, так как эти водоросли являются объектами промысла и марикультуры и широко используются в пищевых целях. Возможно, ламинариевые наделены уникальными механизмами, позволяющими ограничивать рост микромицетов, блокировать их метаболическую активность или вызывать глубокую трансформацию биосинтетических путей, завершающихся продуктами с измененной структурой.

Таким образом, нами впервые показано, что у бурых морских водорослей семейства Fucaceae, как и у обитающих на суше лишайников и травянистых растений, формируется свойственный микроскопическим грибам многокомпонентный профиль микотоксинов, который отсутствует у видов семейства Laminariaceae. Обнаружение настолько контрастной альтернативной ситуации у близких по систематическому положению и ме-

стообитанию водорослей служит убедительным доводом в пользу продолжения разносторонних и углубленных исследований роли грибов, генетически детерминированных на биосинтез токсичных вторичных метаболитов, в процессах жизнедеятельности морских организмов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бубнова Е.Н., Киреев Я.В. Сообщества грибов на талломах бурых водорослей рода *Fucus* в Кандалакшском заливе Белого моря // Микология и фитопатология. 2009. Т. 43. Вып. 5. С. 388–397.
- Буркин А.А., Кононенко Г.П. Особенности накопления микотоксинов в лишайниках // Прикл. биохимия и микробиол. 2013. Т. 49. № 5. С. 522–530.
- Киричук Н.Н., Пивкин М.В. Мицелиальные грибы морской травы *Zostera marina* Linnaeus, 1753 бухты Рифовой (залив Петра Великого, Японское море) // Биол. моря. 2015. Т. 41. № 5. С. 319–323.
- Коновалова О.П., Бубнова Е.Н. Грибы на бурых водорослях *Ascophyllum nodosum* и *Pelvetia canaliculata* в Кандалакшском заливе Белого моря // Микология и фитопатология. 2011. Т. 45. Вып. 3. С. 240–248.
- Коновалова О.П., Бубнова Е.Н., Сидорова И.И. Биология *Stigmidium ascophylli* – гриба-симбионта фукусовых водорослей в Кандалакшском заливе Белого моря // Микология и фитопатология. 2012. Т. 46. Вып. 6. С. 353–360.
- Кононенко Г.П., Буркин А.А. Вторичные метаболиты микромицетов в растениях семейства Fabaceae рода *Trifolium* // Изв. РАН. Сер. биол. 2018. № 2. С. 150–157.
- Кононенко Г.П., Буркин А.А. Вторичные метаболиты микромицетов в растениях семейства Fabaceae родов *Lathyrus*, *Vicia* // Изв. РАН. Сер. биол. 2019. № 3. С. 229–235.
- Boestfleisch C., Drotleff A.M., Ternes W. et al. The invasive ergot *Claviceps purpurea* var. *spartinae* recently established in the European Wadden Sea on common cord grass is genetically homogenous and the sclerotia contain high amounts of ergot alkaloids // Eur. J. Plant Pathol. 2015. V. 141. P. 445–461.
- Cole R.J., Cox R.H. Handbook of toxic fungal metabolites. New York: Academic Press. 1981.
- Flewelling A.J., Ellsworth K.T., Sanford J. et al. Macroalgal endophytes from the Atlantic coast of Canada: a potential source of antibiotic natural products? // Microorganisms. 2013. V. 1. P. 175–187.



- Frisvad J.C., Smedsgaard J., Larsen T.O., Samson R.A.* Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium* // *Stud. Mycol.* 2004. V. 49. P. 201–241.
- Gerhards N., Neubauer L., Tudzynski P., Li S.-M.* Biosynthetic pathways of ergot alkaloids // *Toxins.* 2014. V. 6. P. 3281–3295.
- Izhaki I.* Emodin – a secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants // *New Phytologist.* 2002. V. 155. P. 205–217.
- Jiang Z., Barret M.-O., Boyd K.G. et al.* JM47, a cyclic tetrapeptide HC-toxin analogue from a marine *Fusarium* species // *Phytochemistry.* 2002. V. 60. № 1. P. 33–38.
- Höller U., Wright A.D., Mathee G.F. et al.* Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites // *Mycol. Res.* 2000. V. 104. № 11. P. 1354–1365.
- Kononenko G.P., Burkin A.A., Gavrilova O.P., Gagkaeva T. Yu.* Fungal species and multiple mycotoxin contamination of cultivated grasses and legumes crops // *Agric. Food Sci.* 2015. V. 24. P. 323–330.
- McDonald J.H.* Handbook of Biological Statistics. (3<sup>rd</sup> ed.). Sparky House Publishing. Baltimore, Maryland. 2014.
- Nicoletti R., Trincone A.* Bioactive compounds produced by strains of *Penicillium* and *Talaromyces* of marine origin // *Mar. Drugs.* 2016. V. 14. art. ID 37. <https://doi.org/10.3390/md14020037>
- Park M.S., Fong J.J., Oh S.-Y. et al.* Marine-derived *Penicillium* in Korea: diversity, enzyme activity, and antifungal properties // *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2014. V. 106. P. 331–345.
- Raghukumar S.* Fungi in coastal and oceanic marine ecosystems: Marine fungi. New York: Springer-Verlag. 2017. 383 p.
- Zhang P., Li X., Wang B.-G.* Secondary metabolites from the marine algal-derived endophytic fungi: Chemical diversity and biological activity // *Planta Med.* 2016. V. 82. P. 832–842.

## Toxic Metabolites of Micromycetes in Brown Algae of the Family Fucaceae and Laminariaceae from the White Sea

A. A. Burkin<sup>a</sup>, G. P. Kononenko<sup>a</sup>, A. A. Georgiev<sup>b</sup>, and M. L. Georgieva<sup>b, c</sup>

<sup>a</sup>Federal Scientific Center – K.I. Skryabin and Ya.R. Kovalenko All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Russian Academy of Sciences, Moscow 123022, Russia

<sup>b</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow 119234, Russia

<sup>c</sup>Gause Institute of New Antibiotics, Moscow 119021, Russia

Low-molecular-weight metabolites known as mycotoxins of micromycetes from the genera *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, etc. were studied by enzyme immunoassay in the brown algae *Ascophyllum nodosum*, *Pelvetia canaliculata*, *Fucus vesiculosus*, *Laminaria digitata*, and *Saccharina latissima* collected from the Kandalaksha Gulf, White Sea. T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins of group B, alternariol, ochratoxin A, citrinin, PR-toxin, mycophenolic acid, aflatoxin B<sub>1</sub>, sterigmatocystin, cyclopiazonic acid, emodin, roridin A, and ergot alkaloids were detected in thalli of *A. nodosum*, *P. canaliculata*, and *F. vesiculosus*. The latter species was found to contain almost all of the above-listed mycotoxins in significant amounts. *P. canaliculata* had lower levels of PR-toxin, mycophenolic acid, emodin, and roridin A than those recorded from *A. nodosum*, whereas the levels of the other substances did not differ significantly between these species. *L. digitata* and *S. latissima* contained only ergot alkaloids in trace amounts, and no other mycotoxins were detected.

**Keywords:** algae, *Fucus*, *Ascophyllum*, *Pelvetia*, *Laminaria*, *Saccharina*, mycotoxins, enzyme immunoassay



УДК 594.1:57.017.55:57.017.64

## ПРОСТРАНСТВЕННОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ, РОСТ И РАЗМНОЖЕНИЕ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *MACOMA CALCAREA* (GMELIN, 1791) У БЕРЕГОВ НОВОЙ ЗЕМЛИ

© 2021 г. А. Э. Носкович\*

Мурманский морской биологический институт КНЦ РАН, Мурманск 183010, Россия

\*e-mail: alyona.noskovitch@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.11.2019 г.

После доработки 30.03.2020 г.

Принята к публикации 06.06.2020 г.

Рассмотрены популяционно-биологические характеристики двустворчатого моллюска *Macoma calcarea* (Gmelin, 1791) в восточной части Баренцева моря у берегов архипелага Новая Земля. В районе исследования биомасса макомы изменялась от 3.9 до 350.6 г/м<sup>2</sup>, плотность поселения варьировала от 13.3 до 196.6 экз/м<sup>2</sup>. Показано, что биомасса и плотность поселения моллюсков не зависели от глубины и придонной температуры воды, а размерный состав и темпы роста были сходны на разных глубинах. Отмечено существенное различие продолжительности жизни макомы на глубинах до 100 м (17 лет) и глубже (26 лет). На глубинах менее 100 м основу поселений этого вида составляли молодые особи (до 4 мм); на станциях с большими глубинами были многочисленны как молодь, так и моллюски с длиной раковины около 14.9 мм. Установлено, что половозрелыми особи *M. calcarea* становятся в возрасте 3–4 года при длине раковины более 7.5 мм. На глубоководных станциях половозрелых моллюсков было значительно больше, чем неполовозрелых, а самцов больше, чем самок. У исследованных самок выделены три стадии гаметогенеза. Размер готовых к вымету ооцитов составлял 175 мкм.

**Ключевые слова:** *Macoma calcarea*, двустворчатые моллюски, восточная часть Баренцева моря, биомасса, численность, продолжительность жизни, темпы роста, половозрелость

DOI: 10.31857/S0134347521010071

Двустворчатый моллюск *Macoma calcarea* (Gmelin, 1791) — бореально-арктический вид, широко распространенный во всех морях Арктики и Атлантического океана, а также в Тихом океане (Наумов, 2006). Моллюск обитает на разных глубинах и предпочитает илистые, алевроитовые и песчаные грунты прибрежных мелководий (Rasmussen, 1973; Федяков, 1986). В некоторых донных биоценозах макома доминирует по биомассе (около 1000 г/м<sup>2</sup>) и на мягких грунтах образует поселения с высокой плотностью — более 500 экз/м<sup>2</sup> (Дерюгин, 1928; Антипова, 1979; Бабков, Голиков, 1984; Федяков, 1986). Необычное обилие *M. calcarea* — более 6000 экз/м<sup>2</sup> и до 4000 г/м<sup>2</sup> — отмечено в Чукотском море (Сиренко, Гагаев, 2007). По типу питания макома является собирающим детритофагом, но способна переходить и к сестонтофагии (Rasmussen, 1973). По отношению к температуре *M. calcarea* можно отнести к стено-термным умеренно тепловодным гидробионтам (Наумов, 2006). Известно, что этот вид относится к раздельнополым и расселяется при помощи пелагической планктотрофной личинки (Oertzen,

1972). Макома способна переносить сильные колебания солености воды и существенные, вплоть до отрицательных, колебания температуры. Отмечено, что при низкой солености размеры раковины особей *M. calcarea* небольшие (Цыганкова, Гусев, 2006).

В восточном прибрежье Новой Земли обнаружены обширные поселения *M. calcarea* (Броцкая, Зенкевич, 1939; Антипова, Нейман, 1983; Денисенко и др., 1995), но сведения о биологии и экологии данного моллюска в этом районе отсутствуют, за исключением информации о плотности поселения и биомассе.

Цели настоящего исследования — изучить особенности биологии двустворчатого моллюска *M. calcarea* в зоне влияния охлажденных новоземельских прибрежных вод у архипелага Новая Земля (Баренцево море), а также оценить влияние условий обитания на популяционные и биологические показатели вида.

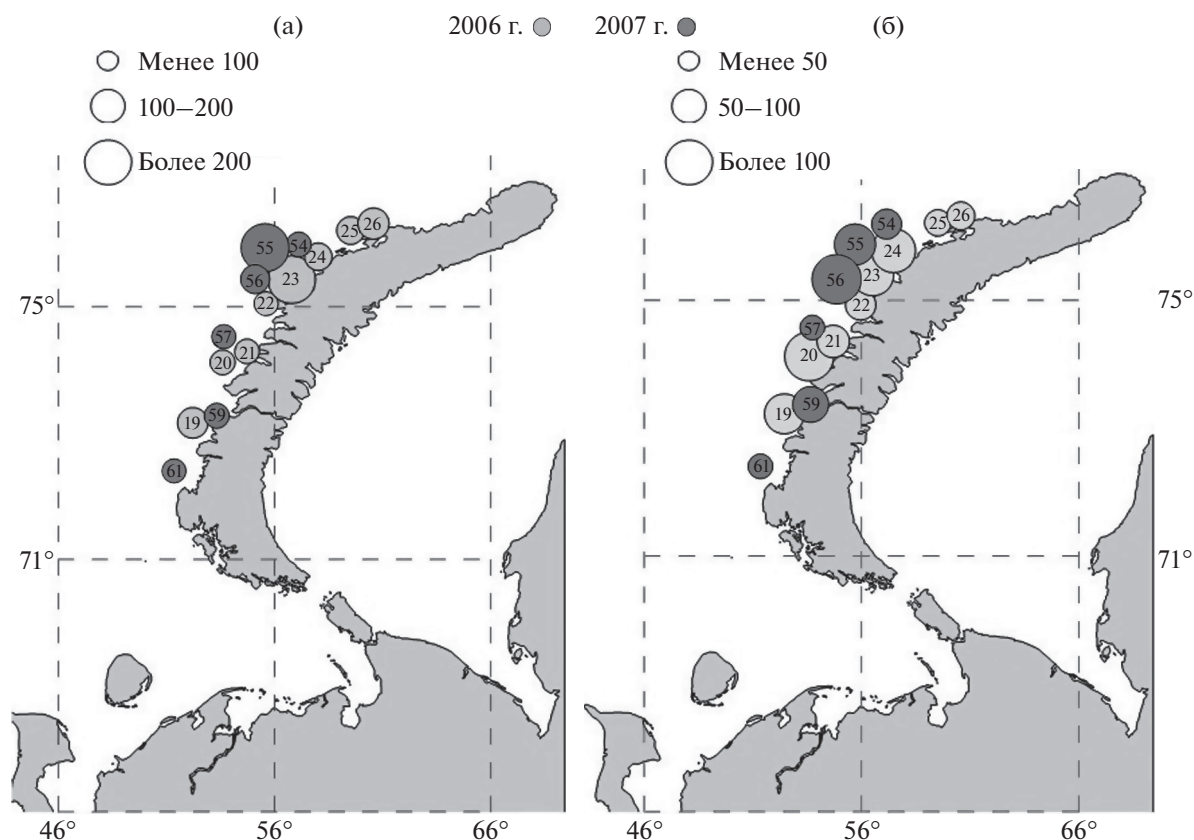


Рис. 1. Карта-схема мест отбора проб и показатели обилия *Macoma calcarea* в прибрежных водах архипелага Новая Земля. а – биомасса, б – плотность поселения; 22–61 – номера станций.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материал, использованный в работе, был собран сотрудниками Мурманского морского биологического института КНЦ РАН на 14 станциях в двух морских экспедициях НИС “Дальние Зелены” в августе–сентябре 2006 и 2007 гг. в восточную часть Баренцева моря к побережью архипелага Новая Земля (рис. 1). Особей *Macoma calcarea* вместе с другими представителями макрозообентоса собирали с помощью дночерпателя Ван-Вина с площадью захвата 0.1 м<sup>2</sup> в трехкратной повторности. При отборе проб учитывали дрейф судна. Пробы промывали через сито с размером ячеи 0.7 мм и фиксировали 4% раствором формалина; после сортировки пробы переводили в 75% раствор этилового спирта. В 2017 г. из проб отобрали макор для дальнейшей обработки.

Анализ факторов среды в районе работ включал результаты океанографического зондирования температуры и солености в придонном слое воды. О гранулометрическом составе донных отложений судили по схеме распределения донных осадков в Баренцевом море (Кленова, 1960; Павлидис, 1995). Популяционно-биологические характеристики *M. calcarea* (биомасса и плотность

поселения) были определены для всех станций (табл. 1).

На девяти станциях (табл. 1) проведен анализ размерно-возрастных характеристик и соотношения полов, определена степень зрелости гонад самок. Всего изучено 256 моллюсков. У всех особей измеряли длину раковины: у крупных экземпляров – штангенциркулем с точностью до 0.1 мм, у мелких – с помощью окулярной линейки бинокулярного микроскопа “Motic”. Возраст моллюсков оценивали, используя несколько взаимодополняющих методов. Наиболее часто подсчитывали кольца зимней остановки роста на наружной поверхности раковины. Этот подход широко распространен при изучении двустворчатых моллюсков, в том числе *M. calcarea* (см.: Золотарев, 1989; Методы... 1990; Лисицына и др., 2017; Gerasimova et al., 2019), хотя имеет замечания со стороны специалистов (Petersen, 1978). Поэтому у моллюсков крупнее 20 мм возраст оценивали еще и по внутренним меткам роста на радиальном спиле раковины, а для дополнительного контроля у 72 особей анализировали метки на спиле в области замка раковины.

Возрастные изменения длины тела оценивали по конечному размеру группы разновозрастных

**Таблица 1.** Характеристика станций, объем проанализированного материала и показатели обилия двустворчатого моллюска *Macoma calcarea* в районе архипелага Новая Земля

№ станции	Характеристика станций				n, экз.	B ± m, г/м <sup>2</sup>	N ± m, экз/м <sup>2</sup>
	T, °C	S, ‰	h, м	Грунт			
<b>2006 г.</b>							
19*	-0.4	34.7	60.0	Средний и крупный песок	29	101.1 ± 0.7	103.3 ± 3.7
20	0.5	34.8	161.0	Ил, глина, галька, щебень	49	18.8 ± 0.2	163.3 ± 3.9
21	0.2	34.8	134.0	То же	16	14.0 ± 1.0	53.3 ± 2.9
22	-1.8	35.2	197.0	То же	12	3.9 ± 0.6	40.0 ± 4.0
23*	-1.5	34.9	154.0	Ил, глина, щебень	24	350.6 ± 3.9	116.6 ± 2.3
24*	-0.7	34.8	149.0	Ил, глина	38	56.3 ± 0.7	130.0 ± 1.1
25	-1.1	34.9	106.0	Глина, щебень, песок, гравий	4	59.7 ± 0.8	13.3 ± 0.1
26	0.05	34.9	80.0	Галька, гравий, илистый песок	7	111.5 ± 5.4	23.3 ± 1.3
<b>2007 г.</b>							
54*	0.7	34.8	165.0	Ил, мелкие камни, глина	17	15.3 ± 0.17	63.3 ± 3.5
55*	0.8	34.8	159.0	Ил, мелкие камни, песок, глина, ракуша	42	321.9 ± 5.22	140.0 ± 4.04
56*	-1.3	34.8	203.0	Ил, мелкие камни, песок, ракуша	59	71.1 ± 0.39	196.6 ± 4.04
57*	1.2	34.9	130.0	Песчано-илистый, камни, валуны, ракуша	8	6.2 ± 0.31	26.6 ± 0.6
59*	0.6	34.6	65.0	Песчано-илистый, мелкие камни, ракуша	31	17.1 ± 1.59	103.3 ± 1.2
61*	1.3	34.8	79.0	Песчано-илистый, ракуша	8	4.0 ± 0.15	26.6 ± 0.1

Примечание. T – придонная температура, S – соленость, h – глубина; n – количество моллюсков; B – средняя биомасса; N – плотность поселения; m – ошибка среднего. \*Станции, на которых проводили анализ размерно-возрастных характеристик моллюсков, а также определяли соотношение полов и состояние гонад.

особей, а ежегодный прирост – по разнице смежных величин конечной длины раковины в последовательном ряду возрастов (Методы..., 1990).

Пол и стадии гаметогенеза моллюсков определяли под микроскопом “Микмед-1” по числу, строению и размерам половых клеток в гонадах. Диаметр ооцитов измеряли с помощью окулярной линейки. Если при вскрытии моллюска гонады отсутствовали, считали, что данный моллюск неполовозрелый. Стадии зрелости гонад анализировали только у самок. Основные этапы гаметогенеза оценивали по Чипперфильду (Chipperfield, 1953): I стадия – начало гаметогенеза (на препарате различимы мелкие ооциты); II стадия – активный гаметогенез (преобладают крупные прикрепленные ооциты); III стадия – преднерестовая (многочисленные крупные свободные ооциты, готовые к вымету); IV стадия – нерестовая (редкие невыметанные зрелые гаметы); 0 стадия – посленерестовая (половые клетки на препаратах гонад не видны).

Для сравнения выборок по показателям обилия, размерному составу и продолжительности жизни моллюсков использовали непараметриче-

ский критерий Манна–Уитни (уровень значимости  $p \leq 0.05$ ) (Ивантер, Коросов, 2003). Соответствие соотношения половозрелых и неполовозрелых особей, а также соотношения полов равномерному распределению 1 : 1 проверяли на основе критерия  $\chi^2$  Пирсона (Закс, 1976; Ивантер, Коросов, 2003). Все станции отбора проб условно были разделены на две группы в зависимости от глубины; сравнивали выборки моллюсков, отобранные на глубине менее 100 м (мелководные) и более 100 м (глубоководные). Статистическая обработка данных выполнена с помощью программ MS Excel и Statistica 6.0; для картографического изображения участков сбора проб и распределения показателей обилия использовали программу Map Viewer 8.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Пространственное распределение и обилие*

В прибрежье архипелага Новая Земля биомасса и плотность поселения *Macoma calcarea* были распределены неравномерно (рис. 1). В целом биомасса макомы в пределах исследованного

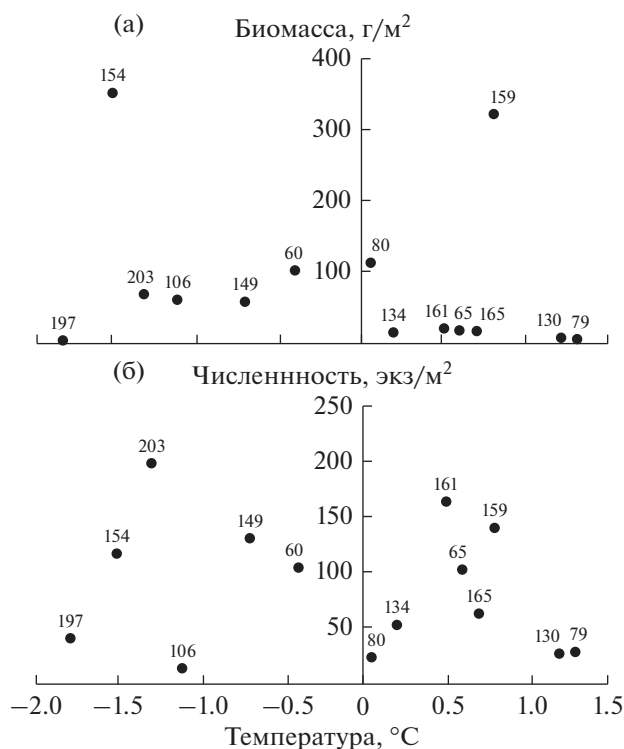


Рис. 2. Биомасса (а) и плотность поселения (б) *Maco-  
ma calcarea* в зависимости от температуры придонной  
воды. Цифрами обозначена глубина.

района варьировала от 3.9 до 350.6 г/м<sup>2</sup>. Максимальные значения отмечены на двух соседних станциях на глубинах 154 и 159 м, минимальные — на удаленных друг от друга станциях на глубинах 79 и 197 м. Плотность поселения макомы варьировала от 13.3 до 196.6 экз/м<sup>2</sup>. Максимальные значения (при низкой биомассе) отмечены на наибольшей глубине 203 м, а минимальные — на глубине 106 м. Различий между показателями обилия для двух групп моллюсков, отобранных на разной глубине, не выявлено: критерий Манна–Уитни для плотности поселения  $U_{эмп} = 8.5$ , для биомассы  $U_{эмп} = 10$ ;  $p \leq 0.05$ . Не выявлено связи между биомассой (плотностью поселения) и придонной температурой воды (коэффициент корреляции равен 0.051 и 0.035 соответственно) (рис. 2).

#### Размерный и возрастной состав

У берегов Новой Земли встречались особи *M. calcarea* с длиной раковины от 1 до 39.2 мм (рис. 3а). На глубинах менее 100 м поселения в основном были представлены моллюсками размером от 1 до 4 мм; отмечена особь с длиной раковины 32.9 мм. На глубинах более 100 м обнаружены мелкие (молодые) особи размером до 4 мм, моллюски с длиной раковины от 10.4 до 19.4 мм, а также несколько особей с максимальными разме-

рами раковины 38.6–39.2 мм (рис. 3а). Различия в размерном составе моллюсков на разных глубинах статистически незначимы (критерий Манна–Уитни  $U_{эмп} = 58$ ;  $U_{эмп} > U_{кр}$ ;  $p \leq 0.05$ ).

На глубинах менее 100 м максимальная продолжительность жизни *M. calcarea* составила 17 лет. Основная часть поселений (30%) была представлена годовиками (рис. 3б). Возраст моллюсков, обитавших глубже 100 м, достигал 26 лет. В поселении также преобладали годовики (11%) и моллюски в возрасте 8 (11%) – 9 лет (9%). Сравнение показало значимое различие возрастного состава ( $U_{эмп} = 128$ ;  $U_{эмп} < U_{кр}$ ;  $p \leq 0.05$ ).

#### Рост

В течение жизни моллюски росли неравномерно. Длина раковины моллюска в возрасте от 1 года до 4 лет ( $6.1 \pm 1.3$  мм) с глубины более 100 м в среднем была несколько больше, чем с глубины менее 100 м ( $5.8 \pm 1.4$  мм) (рис. 4а). Для моллюсков старше 5 лет характерна обратная картина ( $21.4 \pm 1.6$  и  $20.5 \pm 1.7$  мм соответственно). Моллюски, собранные на станциях с глубинами до 100 м, наиболее интенсивно росли в течение довольно длительного периода — с первого года жизни и до 10 лет (средний прирост составлял  $2.0 \pm 0.2$  мм/год). Затем темпы роста снижались и в среднем составляли  $1.0 \pm 0.3$  мм/год (рис. 4б). У моллюсков, собранных на глубинах более 100 м, резкого сокращения темпов роста не отмечено. Наиболее интенсивно моллюски росли в течение первых трех лет жизни ( $2.0 \pm 0.1$  мм/год), затем темпы роста постепенно снижались, в среднем до  $1.2 \pm 0.3$  мм/год. Небольшие колебания темпов роста отмечены в возрасте 9–12 лет ( $1.7 \pm 0.05$  мм/год) (рис. 4б).

#### Половой и репродуктивный состав

На глубинах менее 100 м большая часть поселения (57%) была представлена неполовозрелыми особями (средняя длина раковины  $2.9 \pm 0.2$  мм) (рис. 5а), однако это преобладание не было значимым (критерий  $\chi^2 = 1.0$ ;  $\chi^2_{0.05} = 3.8$ ;  $\chi^2 \geq \chi^2_{0.05}$ ). Среди половозрелых моллюсков на долю самцов приходилось 58% (длина раковины  $18.8 \pm 1.9$  мм), на долю самок — 42% (длина раковины  $21.2 \pm 2.0$  мм) (рис. 5б). Возраст самых мелких половозрелых моллюсков составлял 3–4 года; длина раковины составляла 7.5 мм (самцы) и 7.8 мм (самки). На глубоководных станциях значимо преобладали половозрелые особи (79%) (критерий  $\chi^2 = 23.7$ ;  $\chi^2_{0.01} = 6.6$ ;  $\chi^2 \geq \chi^2_{0.01}$ ) (рис. 5а), среди которых самцов было больше (68%), чем самок (рис. 5б). Длина раковины самцов в среднем составляла  $19.2 \pm 0.8$  мм, самок —  $22.5 \pm 1.2$  мм.

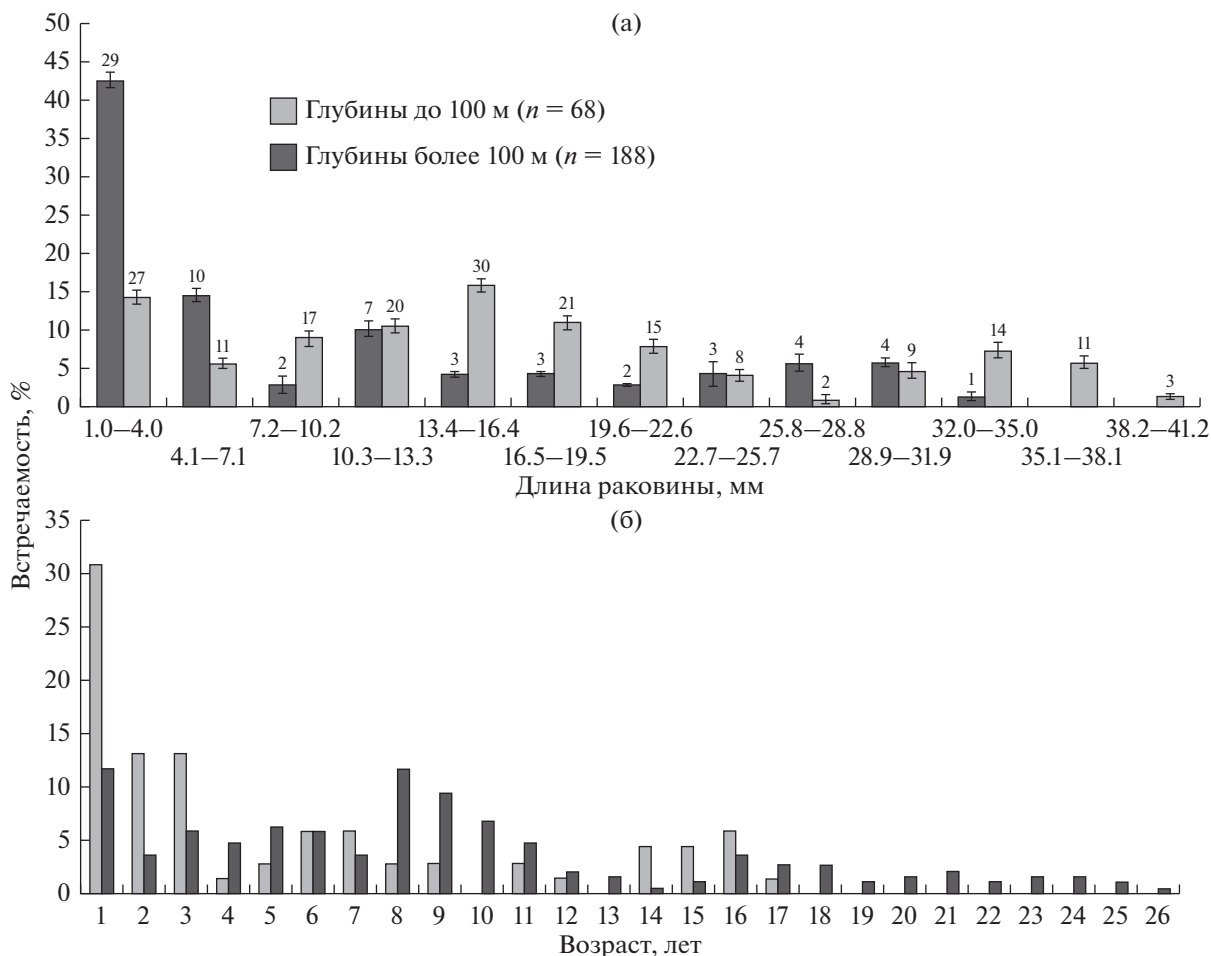


Рис. 3. Размерный (а) и возрастной (б) состав поселения *Macoma calcarea* на разных глубинах. Цифра над столбиками – количество моллюсков в размерном классе, экз.; вертикальные линии – ошибка среднего значения.

Гонады были исследованы у 59 самок. У 15–20% самок (длина раковины  $10.6 \pm 0.6$  мм) гонады находились в начале гаметогенеза; диаметр ооцитов в среднем составлял около 50 мкм. У большинства самок (длина раковины  $20.7 \pm 0.6$  мм) в гонадах наблюдался активный гаметогенез, диаметр ооцитов в среднем составлял около 125 мкм. Доля самок (длина раковины  $34.2 \pm 0.7$  мм) с гонадами в преднерестовой стадии, заполненными готовыми к вымету ооцитами диаметром около 175 мкм, достигала 20–25%.

### ОБСУЖДЕНИЕ

У побережья архипелага Новая Земля гидрологические условия более стабильны, чем в южных районах Баренцева моря, температурные условия суровее, а диапазон сезонных колебаний факторов среды меньше. Самая низкая температура в августе составляла  $-1.8^{\circ}\text{C}$ , а в сентябре  $-1.3^{\circ}\text{C}$ . Относительно низкие значения температуры обусловлены поступлением вод из Карского моря.

Холодные и опресненные воды Карского моря проходят вдоль юго-западного берега о-ва Южный архипелага Новая Земля и двигаются в северном направлении. Примерно на широте прол. Маточкин Шар они частично смешиваются с водами Новоземельского прибрежного течения, что приводит к повышению солёности. В южных новоземельских проливах перенос вод осуществляется в обоих направлениях. Однако сток вод из Баренцева моря превышает их поступление из Карского моря (Ожигин и др., 2016). Придонная температура воды в течение года изменяется от 2 до  $-2^{\circ}\text{C}$ , а показатели солёности варьируют от 33.0 до 34.9‰ (Ожигин и др., 2016). На юге Баренцева моря в течение года диапазон изменения придонной температуры воды шире – от 2 до  $10^{\circ}\text{C}$  (Ожигин и др., 2016). Отмечено, что в августе температура воды у дна здесь варьировала от 7 до  $13^{\circ}\text{C}$  (Носкович, Павлова, 2017). В Белом море *Macoma calcarea* встречается на глубинах от 1 до 249 м при температуре от  $-1.5$  до  $14.4^{\circ}\text{C}$  и солёности от 22.0 до 29.3‰ (Наумов, 2006). В Карском

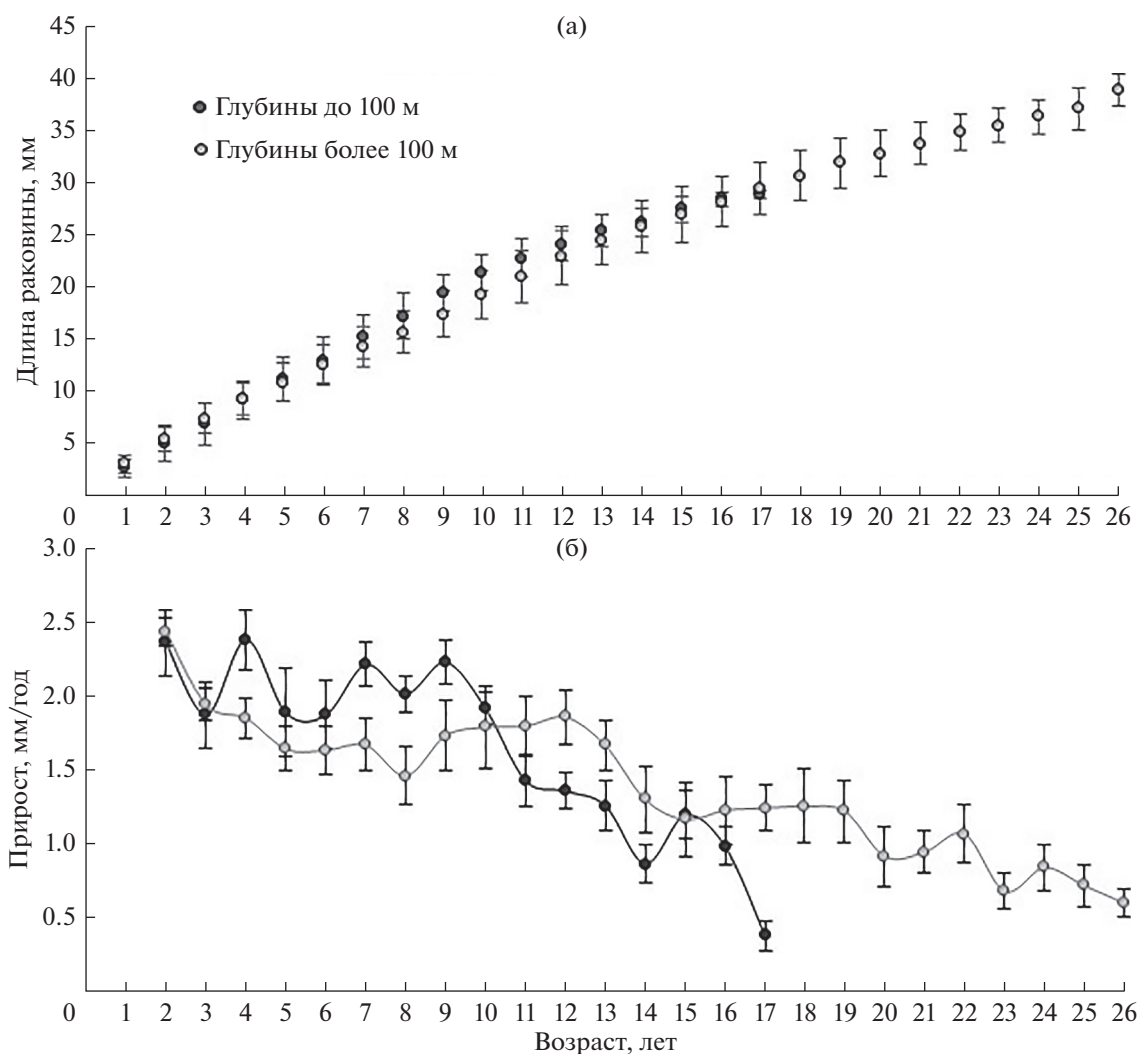


Рис. 4. Возрастные изменения длины (а) и ежегодного прироста (б) раковины у *Macoma calcarea* в поселениях на разной глубине. Вертикальные линии – ошибка среднего значения.

море этот вид обнаружен на глубинах от 4 до 190 м при температуре от  $-1.6$  до  $6.4^{\circ}\text{C}$  и при солёности  $30.6\text{--}33.8\text{‰}$  (Лисицына, Герасимова, 2019).

У берегов Новой Земли *M. calcarea* формирует неоднородные по численности и биомассе поселения, при этом зависимости между показателями обилия моллюсков, глубиной их обитания и придонной температурой не обнаружено. По данным Полярного научно-исследовательского института морского рыбного хозяйства и океанографии, в 2003–2006 гг. в районе Новоземельского мелководья и в Южно-Новоземельском желобе существовали обширные поселения *M. calcarea* с плотностью поселения  $105.3 \pm 8.2$  экз/м<sup>2</sup> и биомассой  $377.2 \pm 63.3$  г/м<sup>2</sup> (Захаров и др., 2018). Известно, что в этом районе области с доминированием *M. calcarea* совпадают с местами обитания краба-стригуна *Chionoecetes opilio*, для которого молодь макомы служит основным пищевым объ-

ектом (Захаров и др., 2018). В более глубоководных районах обитания основу кормовой базы взрослых крабов составляют полихеты. По-видимому, выедание двустворчатого моллюска *M. calcarea* крабом-стригуном опилио привело к таким неравнозначным показателям обилия макомы у берегов Новой Земли. Не исключено, что локальные различия показателей обилия макомы отражают особенности многолетних колебаний донной фауны, характерных для северных морей (Petersen, 1978; Gerasimova et al., 2019).

Известно, что на размеры моллюска влияют солёность, глубина, температура воды и грунт (Rasmussen, 1973), а также содержание растворённого кислорода. Большое количество молоди *M. calcarea* в поселениях на глубинах менее 100 м в прибрежье Новой Земли свидетельствует о благоприятных экологических условиях для размножения этого вида моллюска, а максимальные разме-



ры раковины по сравнению с таковыми в других районах обитания позволяют предположить, что условия обитания здесь благоприятны и для последующего периода жизни *M. calcarea*. Наши данные соответствуют опубликованным данным (Petersen, 1978), полученным для вод Гренландии, где размеры макомы достигали почти 38 мм. В Карском море максимальная длина раковины макомы составляла 36–37 мм (Лисицына, Герасимова, 2019), в Печорском море – 30 мм (Gerasimova et al., 2019), в Белом море максимальные размеры раковины не превышали 24–29 мм (Лисицына и др., 2017). По-видимому, суровые, но относительно стабильные в течение года температурные и соленостные условия обитания, а также другие факторы позволяют *M. calcarea* в прибрежье архипелага Новая Земля достигать крупных размеров и значительной продолжительности жизни.

Сведений о линейном росте *M. calcarea* в других районах обитания мало. Следует отметить, что темпы роста этого вида в прибрежье Новой Земли в первые годы жизни не отличаются от таковых *M. calcarea* из вод западной Гренландии (ежегодный прирост 1.2–2.0 мм/год; см.: Petersen, 1978), но в 1.5 раза ниже, чем в южной части Баренцева моря (Носкович, 2018), и в 1.5–2 раза ниже, чем у беломорских маком (Лисицына и др., 2017). Моллюски из Печорского моря на ранних стадиях развития характеризуются низкой скоростью роста (Gerasimova et al., 2019).

У берегов Новой Земли продолжительность жизни *M. calcarea* сравнительно высокая. В более тепловодных районах обитания этот показатель ниже. Например, в юго-восточной части Балтийского моря встречались макомы в возрасте от 2 до 6 лет, а в южной части – до 14 лет (Юргенс, 2006). В Баренцевом и Карском морях отмечены моллюски в возрасте 15 лет (Антипова, Нейман, 1983; Золотарев, 1989), в южной части Баренцева моря и в Печорском море – до 10–13 лет (Носкович, 2018). По другим данным продолжительность жизни *M. calcarea* в Печорском море может достигать 15 лет (Gerasimova et al., 2019). В Карском море обнаружены макомы, возраст которых составлял 18–20 лет (Лисицына, Герасимова, 2019). В водах западной Гренландии продолжительность жизни *M. calcarea* оценена в 17 лет (Petersen, 1978).

Известно, что у побережья западной Гренландии *M. calcarea* достигает половой зрелости при длине раковины 9 мм (Petersen, 1978), а на юге Баренцева моря – 5 мм (Носкович, Павлова, 2017). Согласно нашим данным, у побережья Новой Земли макомы имели развитую гонаду при длине раковины около 7.5 мм.

На станциях с глубинами менее 100 м соотношение самцов и самок было одинаковым; в поселениях на глубинах более 100 м наблюдалось яв-

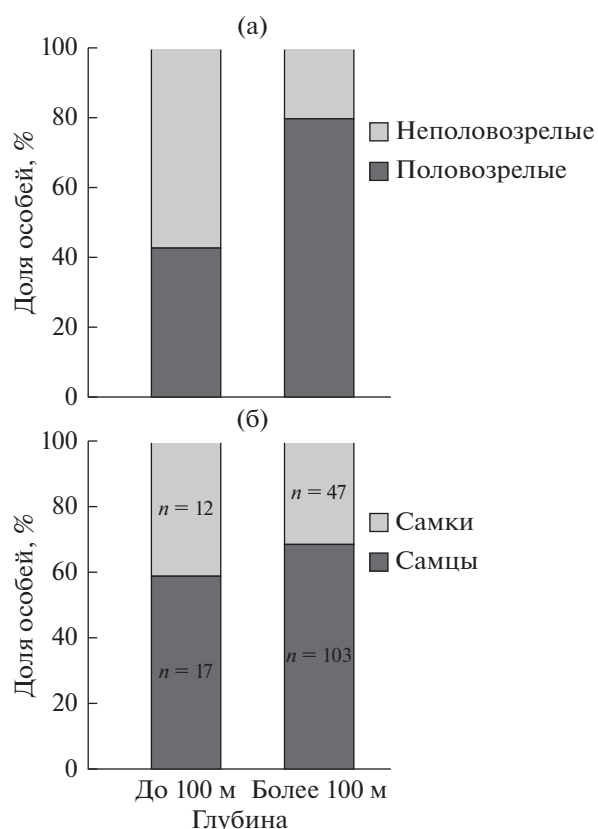


Рис. 5. Соотношение половозрелых и неполовозрелых особей (а), а также соотношение полов (б) у *Macoma calcarea* в поселениях на разной глубине.

ное преобладание самцов. Такое соотношение полов может быть вызвано как генетическими, так и экологическими факторами, определяющими формирование пола или дифференцированную выживаемость самок и самцов (Одум, 1986). В водах западной Гренландии соотношение полов *M. calcarea* составляло 1 : 1 (Petersen, 1978). Известно, что у некоторых видов двусторчатых моллюсков наблюдается явление протандрии, когда у ювенильных особей сначала формируются мужские гонады (Сое, 1943). У исландского гребешка *Chlamys islandica*, обитающего у восточного Мурмана, в 3–5 лет доля самцов в популяции выше доли самок. По мере роста соотношение между полами выравнивается, но среди моллюсков старше восьми лет вновь наблюдается тенденция к преобладанию самцов (Ржавский и др., 2010). У черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* соотношение полов также может изменяться в сторону преобладания самцов; высказано предположение, что это связано с инверсией пола у самок, происходящей под воздействием загрязняющих веществ (Челядина и др., 2016). У беломорской мидии *Mytilus edulis* L. соотношение полов в поселении практически одинаковое (Касьянов, 1989).

Согласно нашим данным, в гонадах *M. calcarea* размеры ооцитов, готовых к вымету (175 мкм), заметно больше, чем размеры зрелых яйцеклеток (95 мкм), указанные для моллюсков этого же вида из побережья Гренландии и западной части Балтийского моря (Ockelmann, 1958; Oertzen, 1972), но гораздо мельче размеров яйцеклеток (200 мкм) особей из Белого моря (Наумов, 2006).

Несмотря на ограниченный период сбора материала, результаты наших исследований позволяют предположить, что нерест *M. calcarea* в районе Новой Земли может проходить в осенние месяцы при температуре воды около 1.5°C. Известно, что в Балтийском море личинки макомы оседают в зимние и весенние месяцы (Oertzen, 1972). В водах Гренландии в периоды с очень низкой температурой воды (-1.7°C) моллюски размножаются не каждый год, а личинки не оседают, однако при наступлении благоприятных температурных условий возможны две волны нереста: в марте—апреле и июле—августе (Ockelmann, 1958).

Таким образом, неоднородность условий среды обитания в районе архипелага Новая Земля сказывается на абсолютной величине популяционно-биологических характеристик *M. calcarea*. В частности, с увеличением глубины обитания увеличивается продолжительность жизни макомы, несколько изменяется характер линейного роста и соотношение полов. Однако биомасса и численность макомы не зависят от придонной температуры воды, а размерный состав населения и темпы роста моллюсков в исследованном диапазоне глубин значимо не различаются. В прибрежье архипелага возрастные и размерные классы *M. calcarea* представлены в широком диапазоне, без дискретности; для популяции этого вида в целом характерно высокое содержание молодежи, что говорит о благоприятных экологических условиях для размножения, роста и жизнедеятельности моллюска.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках программы исследований “Донные сообщества Баренцева моря, его водосборного бассейна и сопредельных вод: экология, биоразнообразие, роль чужеродных видов” (№ госрегистрации: АААА-А19-119011690138-0, № ГЗ 0228-2019-

0025), запланированных в Мурманской морском биологическом институте.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность к. б. н. Л.В. Павловой (лаборатория зообентоса ММБИ КНЦ РАН) за ценные замечания при написании работы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Антипова Т.В. Распределение, экология, рост и продукция двустворчатых моллюсков Баренцева и Карского морей: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Москва. 1979. 18 с.
- Антипова Т.В., Нейман А.А. Распределение возрастных групп некоторых видов двустворчатых моллюсков в юго-восточной части Баренцева и в Карском море // Моллюски. Систематика, экология и закономерности распространения / Всесоюз. совещ. по изучению моллюсков: Автореф. докл. Л.: Наука. 1983. С. 168–171.
- Бабков А.И., Голиков А.Н. Гидробиокомплексы Белого моря. Л.: Зоол. ин-т РАН. 1984. 104 с.
- Броцкая В.А., Зенкевич Л.А. Количественный учет донной фауны Баренцева моря // Тр. ВНИРО. 1939. Т. 4. С. 5–126.
- Денисенко С.Г., Луппова Е.Н., Денисенко Н.В. и др. Количественное распределение бентоса и структура донных сообществ на Приновоземельском шельфе Баренцева моря // Среда обитания и экосистемы Новой Земли. Архипелаг и шельф. Апатиты: Изд. КНЦ РАН. 1995. С. 66–79.
- Дерюгин К.М. Фауна Белого моря и условия ее существования // Исслед. морей СССР. Л.: Гос. гидрол. ин-т. 1928. № 7–8. 510 с.
- Закс Л. Статистическое оценивание. М.: Статистика. 1976. 600 с.
- Захаров Д.В., Манушин И.Е., Стрелкова Н.А. и др. Характеристика кормовой базы и питание краба-стригуна опилио в Баренцевом море // Тр. ВНИРО. 2018. Т. 172. С. 70–90.
- Золотарев В.Н. Склерохронология морских двустворчатых моллюсков. Киев: Наукова думка. 1989. 112 с.
- Ивантер Э.В., Коросов А.В. Введение в количественную биологию: учеб. пособ. Петрозаводск: ПетрГУ. 2003. 304 с.
- Касьянов В.Л. Репродуктивная стратегия морских двустворчатых моллюсков и иглокожих. Л.: Наука. 1989. 181 с.
- Кленова М.В. Геология Баренцева моря. Л.: Изд. АН СССР. 1960. 376 с.
- Лисицына К.Н., Герасимова А.В., Максимович Н.В. Дем-экологические исследования *Masota calcarea* (Gmelin) в Белом море // XIII Всерос. конф. с международным участием “Изучение, рациональное использование и охрана природных ресурсов Белого моря”. Сб. материалов. СПб. 2017. С. 123–126.
- Лисицына К.Н., Герасимова А.В. Рост и распределение *Masota calcarea* (Gmelin) в Карском море // Тр. VII Международ. науч.-практ. конф. “Морские исследования и образование (MARESEDU-2018)”: в 4-х т. Тверь: ООО “ПолиПРЕСС”. 2019. Т. III. С. 418–421.



- Методы изучения двустворчатых моллюсков // Тр. Зоол. ин-та АН СССР / Под ред. Г.Л. Шкорбатова, Я.И. Старобогатова. Л.: АН СССР. 1990. Т. 219. 208 с.
- Наумов А.Д. Двустворчатые моллюски Белого моря. Опыт эколого-фаунистического анализа. СПб.: Зоол. ин-т РАН. 2006. 367 с.
- Носкович А.Э. Изменчивость скорости роста двустворчатого моллюска *Macoma calcarea* (Bivalvia, Tellinidae) в разных районах Баренцева моря // Современные эколого-биологические и химические исследования, техника и технология производств. Мурманск: Изд-во МГТУ. 2018. С. 372–378.
- Носкович А.Э., Павлова Л.В. Репродуктивные особенности популяций двустворчатого моллюска *Macoma calcarea* (Bivalvia, Tellinidae) в Баренцевом и Печорском морях // Вестн. МГТУ. 2017. Т. 20. № 2. С. 463–471.
- Одум Ю. Экология: В 2-х т. М.: Мир. 1986. Т. 2. 376 с.
- Ожигин В.К., Ившин В.А., Трофимов А.Г. и др. Воды Баренцева моря: структура, циркуляция, изменчивость. Мурманск: ПИНРО. 2016. 260 с.
- Павлидис М.А. Особенности распределения поверхностных осадков восточной части Баренцева моря // Океанология. 1995. Т. 34. № 4. С. 614–622.
- Ржавский А.В., Буяновский А.И., Брутаев Т.А. Биология исландского гребешка *Chlamys islandica* (Bivalvia, Pectinidae) и пространственно-временная организация его поселений в губах восточного Мурмана // Успехи соврем. биол. 2010. Т. 130. № 1. С. 63–79.
- Сиренко Б.И., Гагаев С.Ю. Необычное обилие макробентоса и тихоокеанские вселенцы в Чукотском море // Биол. моря. 2007. Т. 33. № 6. С. 399–407.
- Федяков В.В. Закономерности распределения моллюсков Белого моря. Л.: Зоол. ин-т АН СССР. 1986. 127 с.
- Цыганкова А.В., Гусев Е.А. Палеоэкологическая характеристика плейстоценовых двустворчатых моллюсков Енисейского залива. Современная палеонтология: классические и новейшие методы // Тез. докл. 3-й Всерос. науч. школы молодых ученых-палеонтологов. М. 2006. С. 72–75.
- Челядина Н.С., Поспелова Н.В., Понов М.А. и др. Инверсия пола мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam., культивируемой у берегов Крыма (Чёрное море) // Материалы Всерос. молодежной гидробиол. конф. “Перспективы и проблемы современной гидробиологии”, пос. Борок, 10–13 ноября 2016 г. Ярославль: Филигрань. 2016. С. 201–203.
- Юргенс Е.М. Экологическая характеристика моллюска *Macoma balthica* (Linne, 1758) в южной части Балтийского моря: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Калининград: Изд-во Рос. гос. ун-та им. И. Канта. 2006. 21 с.
- Chipperfield P.W. Observation on the breeding and settlement of *Mytilus edulis* (L.) in the British waters // J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 1953. V. 32. № 2. P. 449–476.
- Coe W.R. Sexual differentiation in mollusks. I. Pelecypods // Q. Rev. Biol. 1943. V. 18. № 2. P. 154–164.
- Gerasimova A.V., Filippova N.A., Lisitsyna K.N. et al. Distribution and growth of bivalve molluscs *Serripes groenlandicus* (Mohr) and *Macoma calcarea* (Gmelin) in the Pechora Sea // Polar Biol. 2019. V. 42. № 9. P. 1685–1702.
- Ockelmann W.K. The zoology of East Greenland: Marine Lamellibranchiata // Medd. Groenl. 1958. V. 122. № 4. 256 p.
- Oertzen J.-A. Cycles and rates of reproduction of six Baltic Sea bivalves of different zoogeographical origin // Mar. Biol. 1972. V. 14. P. 143–149.
- Petersen G.H. Life cycles and population dynamics of marine benthic bivalves from the Disko Bugt area of West Greenland // Ophelia. 1978. V. 17. № 1. P. 95–120.
- Rasmussen E. Systematics and ecology of the Isefjord marine fauna (Denmark) // Ophelia. 1973. V. 11. P. 5–495.

## The Spatial Distribution, Growth, and Reproduction of the Bivalve *Macoma calcarea* (Gmelin, 1791) off the Novaya Zemlya Coast

A. E. Noskovich

Murmansk Marine Biological Institute, Kola Scientific Center, Russian Academy of Sciences,  
Murmansk 183010, Russia

The population and biological characteristics of the bivalve mollusk *Macoma calcarea* (Gmelin, 1791) off the Novaya Zemlya Archipelago, eastern Barents Sea, are considered in the present report. The biomass of *Macoma* clams in the study area varied from 3.9 to 350.6 g/m<sup>2</sup>; the population density, from 13.3 to 196.6 ind./m<sup>2</sup>. It was shown that the biomass and population density of clams do not depend on depth and near-bottom water temperature; the size structure and growth rates were similar at different depths. The life span was found to differ significantly between clams that lived at depths shallower than 100 m (17 years) and deeper (26 years). At depths shallower than 100 m, aggregations of this species consisted mainly of juveniles (up to 4 mm); at the stations with greater depths, both juveniles and individuals with a shell length of 14.9 mm were found in abundance. Individuals of *M. calcarea* reach sexual maturity at an age of 3–4 yr, having a shell length of over 7.5 mm. At the stations with greater depths, there were significantly more mature clams than immature ones, and more males than females. Three stages of gametogenesis were identified in the examined females. The size of mature, ready to be spawned, oocytes was 175 µm.

**Keywords:** *Macoma calcarea*, bivalves, eastern Barents Sea, biomass, abundance, life span, growth rate, sexual maturity

УДК 597.556.333.7

## РАЗМЕРНО-ВОЗРАСТНАЯ СТРУКТУРА, РОСТ И СОЗРЕВАНИЕ ПЯТНИСТОГО СОМА *ARIUS MACULATUS* (THUNBERG, 1792) (SILURIFORMES: ARIIDAE) ИЗ ЭСТУАРИЯ РЕКИ МЕКОНГ (ВЬЕТНАМ)

© 2021 г. Д. Н. Куцын<sup>1,2,3,\*</sup>, Э. Р. Аблязов<sup>1,2,3</sup>, Ба Хай Чыонг<sup>3</sup>, Нгуен Динь Ку<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН, Севастополь 299011, Россия

<sup>2</sup>Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва 119071, Россия

<sup>3</sup>Южное отделение Российско-Вьетнамского тропического центра, Хошимин, Вьетнам

\*e-mail: makaira88@gmail.com

Поступила в редакцию 25.12.2019 г.

После доработки 20.03.2020 г.

Принята к публикации 22.10.2020 г.

Впервые изучены размерно-возрастная структура, рост и созревание пятнистого сома *Arius maculatus* (Thunberg, 1792) из эстуария р. Хау (дельта р. Меконг, Вьетнам). Исследованы 460 экземпляров рыб, собранных в январе–марте 2019 г. На отолитах визуализированы годовые кольца, формирование которых обусловлено чередованием сухого сезона и сезона дождей. Соотношение самцов и самок в уловах составляло 1 : 1.81. Доля самцов снижалась в старших возрастных группах. Максимальная общая длина тела самок составляла 21.9 см, самцов – 23.7 см. Максимальный зарегистрированный возраст самок достигал 7+, а самцов 8+. Различий в росте между полами не выявлено. Параметры уравнения Бергаланфи для обоих полов по эмпирическим данным:  $L_{\infty} = 28.3$  см,  $k = 0.15$ /год,  $t_0 = -1.03$  лет; индекс линейного роста  $\phi = 2.08$ ; коэффициенты аллометрической зависимости массы тела от длины:  $a = 0.0054$ ,  $b = 3.22$ . Созревание начинается при длине 13 см в возрасте трех лет и завершается при длине 18 см в возрасте шести лет; 50% особей созревает при длине 15 см в четырехлетнем возрасте. Между полами различий в сроках созревания не выявлено. *A. maculatus* из дельты р. Меконг характеризуется низким темпом роста по сравнению с таковым у рыб из других популяций, что может быть связано с лабильными условиями обитания в эстуарной зоне.

**Ключевые слова:** пятнистый сом, *Arius maculatus*, возраст, рост, созревание, Меконг, дельта, эстуарий

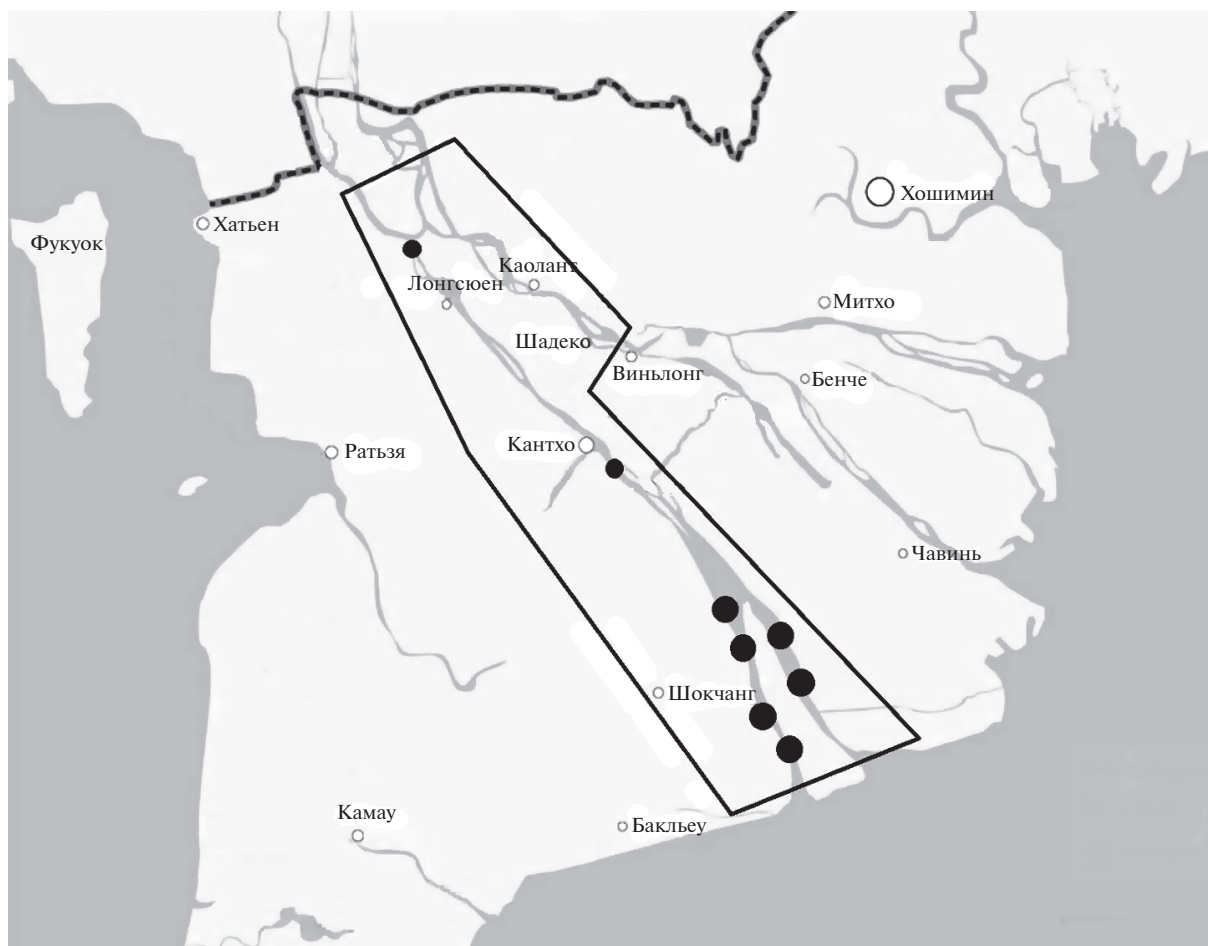
**DOI:** 10.31857/S0134347521010058

Меконг – крупнейшая река Индокитая, протяженность которой составляет около 4500 км, а площадь бассейна 810 тыс. км<sup>2</sup>. Р. Меконг характеризуется исключительно высокими продуктивностью и биоразнообразием, сопоставимыми с таковыми бассейна р. Амазонка (Ziv et al., 2012). При этом на всем протяжении р. Меконг находится под чрезвычайно высоким антропогенным давлением, связанным с гидростроительством, рыболовством, судоходством, бурным развитием аквакультуры, сельского хозяйства и промышленности в Азиатско-Тихоокеанском регионе. За последние 30 лет гидрологический режим в дельте реки радикально изменился, что связано с интенсификацией сельскохозяйственного производства, а именно с выращиванием риса (Wassmann et al., 2004). Происходящие на этом фоне климатические изменения способствуют быстрой трансформации экосистемы р. Меконг, угрожая частичной или даже полной утратой ее компонентов, поэтому задача их изучения очень важна.

В настоящее время интерес к экосистеме бассейна р. Меконг существенно вырос, активно изучаются биологическое разнообразие и структура ихтиоценов, проводится инвентаризация ихтиофауны (Valbo-Jørgensen et al., 2009; Chea et al., 2017; Болтачев и др., 2018). При этом биологии отдельных видов уделяется гораздо меньше внимания.

Пятнистый сом *Arius maculatus* (Thunberg, 1792) – демерсальный вид, населяющий прибрежные воды Индо-Западно-Тихоокеанской зоогеографической области Мирового океана. Распространен у западного и восточного побережья Индии, Шри-Ланки, Пакистана, Бангладеш, Мьянмы до Арафурского моря и Индо-Австралийского архипелага (Russell, Houston, 1989). В пределах р. Меконг приурочен к нижнему течению (Серов, 1994; Rainboth, 1996; Tran et al., 2013), где является объектом местного промысла.

Биология *A. maculatus* изучена крайне слабо. Некоторые сведения о росте, возрастном составе,



**Рис. 1.** Карта-схема района исследований (выделен рамкой). Черными кругами отмечены места поимки пятнистого сома *Arius maculatus*.

смертности и зависимости массы от длины тела известны для популяций этого вида у побережья о-ва Тайвань (Chu et al., 2011; Chu et al., 2012), Индонезии (Velasco, Oddone, 2004) и Малайзии (Mazlan et al., 2008). Данные об особенностях биологии *A. maculatus* эстуарной системы р. Меконг в литературе отсутствуют.

Изучение возраста и роста имеет как теоретическое, так и прикладное значение. Большой интерес представляет эколого-географическая изменчивость этих показателей, позволяющая установить основные закономерности адаптации и формообразования. В то же время без знания биологических особенностей популяции невозможно оценить ее состояние и продукционный потенциал, а значит, рационально организовать промысел и охрану природы. Цель настоящего исследования – изучить распределение, возрастной состав, особенности роста и созревания пятнистого сома *A. maculatus* в дельте р. Меконг.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Район исследований включал крупнейшие рукава дельты р. Меконг – реки Хау и Тиен (рис. 1). На изучаемой акватории в январе–марте 2019 г. выполнено 133 траления. В качестве орудия лова использовали бимтрал (ширина рамы 4 м, высота – 40 см; размер ячеей тралового мешка 10 мм). На каждой станции измеряли соленость придонного слоя воды при помощи портативного солемера HM Digital TDS-3.

Полный биологический анализ материала проводили по стандартным методикам (Правдин, 1966). Общую длину рыб ( $TL$ ) измеряли с точностью до 0.1 см, массу ( $W$ ) – до 0.01 г. Возраст особей определяли по отолитам. В связи с хорошей визуализацией зон роста дополнительную обработку отолитов не проводили. Годовым кольцом считали границу между внутренним краем широкой опаковой (светлой в отраженном свете) зоны (соответствует высокому темпу роста) и внешним краем узкой транслюцентной (темной в отраженном свете) зоны (соответствует низкому темпу

раста). Отолиты измеряли при 15-кратном увеличении. Диаметр отолита ( $OL$ ) определяли как максимальное расстояние между ростральным и каудальным краями с точностью до 0.01 мм (рис. 2). Диаметр годового кольца определяли как расстояние между ростральным и каудальным краями транслюцентной зоны. Объем исследованного материала составил 460 экз.

При описании размерно-возрастной структуры использовали следующие статистические критерии:  $F$ -критерий Фишера для оценки качества регрессий,  $W$ -критерий Шапиро–Уилка для проверки нормальности распределения,  $U$ -критерий Манна–Уитни для оценки различий длины и массы в выборках самок и самцов в уловах, а также критерий  $\chi^2$  для оценки соотношения полов. Статистический анализ выполнен с помощью программных пакетов MS Excel и Statistica 12.

Обратные расчисления проводили по формуле:  $L_i = (S_i(L_c - c)/S_c) + c$ , где  $S_i$  – диаметр годового кольца (мм), соответствующий возрасту  $i$ ;  $L_c$  –  $TL$  рыбы при поимке, см;  $S_c$  – диаметр отолита ( $OL$ , мм) при поимке;  $c$  – свободный член линейной регрессии  $TL$  от  $OL$  (Johdal et al., 2001). Для анализа линейного роста и увеличения массы тела применяли уравнения Бергаланфи (Von Bertalanffy, 1938; Мина, Клевезаль, 1976; Рикер, 1979):  $L = L_\infty(1 - e^{-k(t - t_0)})$  и  $W = W_\infty(1 - e^{-k(t - t_0)})^b$ , где  $L_\infty$  – асимптотическая длина, см;  $W_\infty$  – асимптотическая масса, г;  $k$  – константа, характеризующая скорость приближения  $L$  к  $L_\infty$ /год;  $t_0$  – возраст рыбы, длина и масса которой в рассматриваемой модели равна 0, год;  $b$  – показатель степени в зависимости массы от длины ( $W = aL^b$ ). Рассчитывали индекс роста для линейных размеров и массы (Pauly et al., 1988):  $\phi = \lg k + 2\lg L_\infty$  и  $\phi' = \lg k + (2\lg W_\infty)/3$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Распределение.** В пределах акватории р. Хау пятнистый сом *Arius maculatus* встречался преимущественно в эстуарной зоне при солености придонного слоя воды 5‰ и выше. Единичные экземпляры зарегистрированы на акватории у городов Кантхо и Лонгсюен, где соленость воды не превышала 0.8‰. Преобладающее число особей выловлено при тралении на глубине 5–15 м в основном русле реки. Установлена приуроченность пятнистого сома к твердым глинистым грунтам.

**Возраст.** Отолиты *A. maculatus* имели хорошо выраженные opakовые и гиалиновые зоны (рис. 2). Значимые различия диаметра условных годовых колец отмечены в первых пяти группах (рис. 3). Годовые кольца у разных особей формировались практически одновременно; для годовых колец характерна регулярность закладки, связанная с

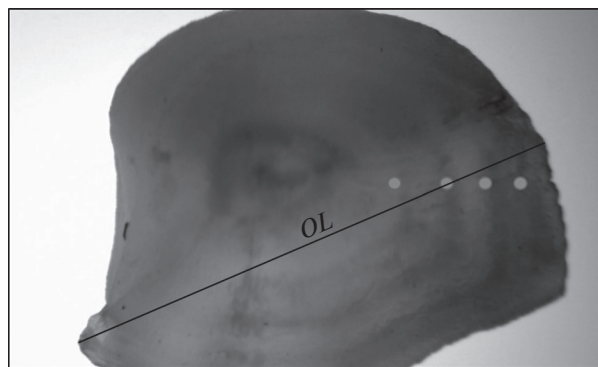


Рис. 2. Отолит самки 4+ *Arius maculatus* в падающем свете,  $TL = 166$  мм.  $OL$  – диаметр отолита, точками отмечены годовые кольца.

влиянием циклически изменяющихся факторов среды. Анализ краевых приростов показал, что формирование opakовой зоны, соответствующей высокому темпу роста, завершается к окончанию сухого сезона. Замедление роста отолитов приурочено к сезону дождей и сопровождается закладкой на отолитах узкой транслюцентной зоны.

**Соотношение полов и размерно-возрастной состав уловов.** Общее соотношение самцов и самок в уловах составило 1 : 1.81, что статистически значимо отличалось от равного соотношения полов ( $\chi^2 = 16.4$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0.001$ ). При увеличении возраста рыб соотношение полов изменялось. В первые годы жизни оно было близко к 1 : 1, в старших возрастных группах доля самцов снижалась. Примечательно, что самой крупной и “старой” рыбой в уловах оказался самец ( $TL = 23.7$  см, масса тела 201 г, возраст 8+).

Линейные размеры самок *A. maculatus* изменялись от 12.0 до 21.9 см, самцов – от 11.9 до 23.7 см при средних значениях  $TL$   $15.78 \pm 0.18$  и  $14.85 \pm 0.23$  см соответственно (рис. 4а). В уловах распределение по линейным размерам отличалось от нормального как у самок, так и у самцов ( $W$ -критерий Шапиро–Уилка,  $n_{\text{самок}} = 127$ ,  $p = 0.002$ ;  $n_{\text{самцов}} = 71$ ,  $p < 0.001$ ). Межполовые различия средней  $TL$  статистически достоверны ( $U$ -критерий Манна–Уитни,  $n_{\text{самок}} = 127$ ,  $n_{\text{самцов}} = 71$ ,  $p < 0.001$ ), что связано с преобладанием самок в старших возрастных группах. Среднее значение  $TL$  всех половозрелых особей ( $n = 198$ ) составило  $15.45 \pm 0.15$  см.

Масса тела самок варьировала в пределах 16.0–117.4 г, самцов – 14.1–201.2 г при средних значениях  $41.6 \pm 1.8$  и  $35.3 \pm 2.8$  г соответственно (рис. 4б). Распределение по массе тела и самок, и самцов также отличалось от нормального ( $W$ -критерий Шапиро–Уилка,  $n_{\text{самок}} = 127$ ,  $n_{\text{самцов}} = 71$ ,  $p < 0.001$ ). Различия средней массы тела между полами были достоверны ( $U$ -критерий Манна–Уитни,  $n_{\text{самок}} = 127$ ,

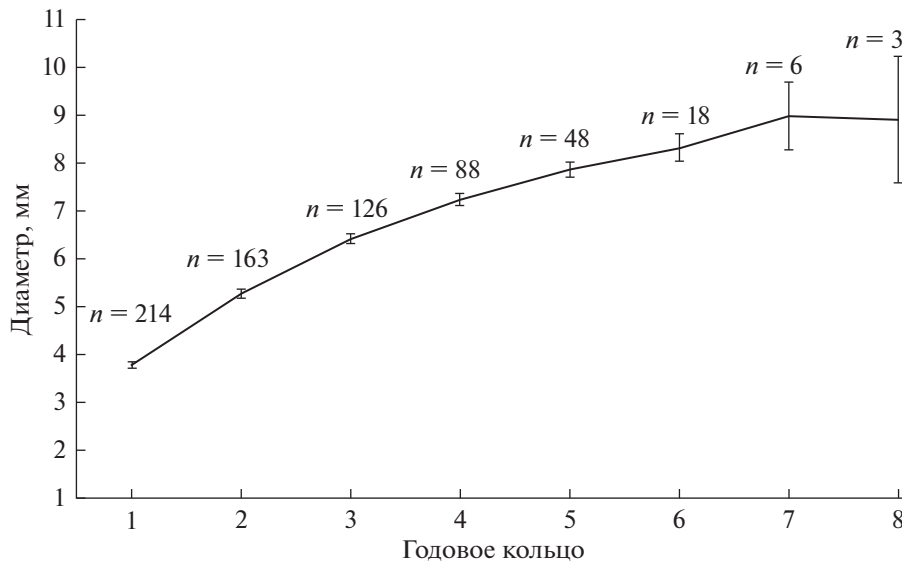


Рис. 3. Диаметр годовых колец *Arius maculatus* из эстуария р. Хау.

$n_{\text{самцов}} = 71, p < 0.05$ ) в связи с преобладанием самок старшего возраста. Средняя масса тела всех половозрелых особей ( $n = 198$ ) составила  $39.3 \pm 1.51$  г.

Необходимо отметить, что в связи со спецификой орудия лова в уловах преобладали неполовозрелые особи (51%), доля сеголеток составляла 29%. Распределение половозрелой части уловов *A. maculatus* по возрасту представлено на рис. 4в. Максимальный возраст самок достигал 7+, а самцов 8+. При этом доля самцов 4+ была практически в 2 раза меньше, чем 3+. В отличие от самок, самцы 6+ и 7+ в уловах не встречались, поэтому поимка самца 8+ рассматривается как единственный удачный случай.

По результатам определения возраста 206 экз. пятнистого сома составлен размерно-возрастной ключ (табл. 1), согласно которому установлен

возраст еще 254 особей преимущественно младших возрастных групп (0+ и 1+).

Зависимость  $TL$  (см) от длины отолита  $OL$  (мм) у *A. maculatus* аппроксимируется линейной регрессией  $TL = 2.28OL + 2.12$  при  $R^2 = 0.95$  ( $n = 214$ ). Зависимость статистически значима ( $F$ -критерий,  $p < 0.05$ ).

Увеличение размеров тела пропорционально росту регистрирующих структур (Мина, Клевезаль, 1976), поэтому уравнение регрессии может применяться для обратных расчислений. Поскольку уравнение позволяет рассчитать длину лишь для усредненной особи, мы применили подход, учитывающий индивидуальные значения  $OL$  и  $TL$ , с одной стороны, и свободный член в уравнении регрессии – с другой (см. раздел “Материал и методика”).

Таблица 1. Размерно-возрастной ключ для обоих полов *Arius maculatus* из эстуария р. Хау (дельта р. Меконг)

TL, см	Возраст, лет									Итого, экз.
	0+	1+	2+	3+	4+	5+	6+	7+	8+	
4.1–6.0	13									13
6.1–8.0	<b>20</b>									20
8.1–10.0	17	10								27
10.1–12.0		<b>24</b>	6	2						32
12.1–14.0		3	<b>22</b>	7	1					33
14.1–16.0			3	<b>32</b>	<b>15</b>	1		1		52
16.1–18.0			1	1	12	<b>5</b>				19
18.1–20.0						4	<b>2</b>			6
20.1–22.0						1	1	<b>1</b>		3
22.1–24.0									<b>1</b>	1

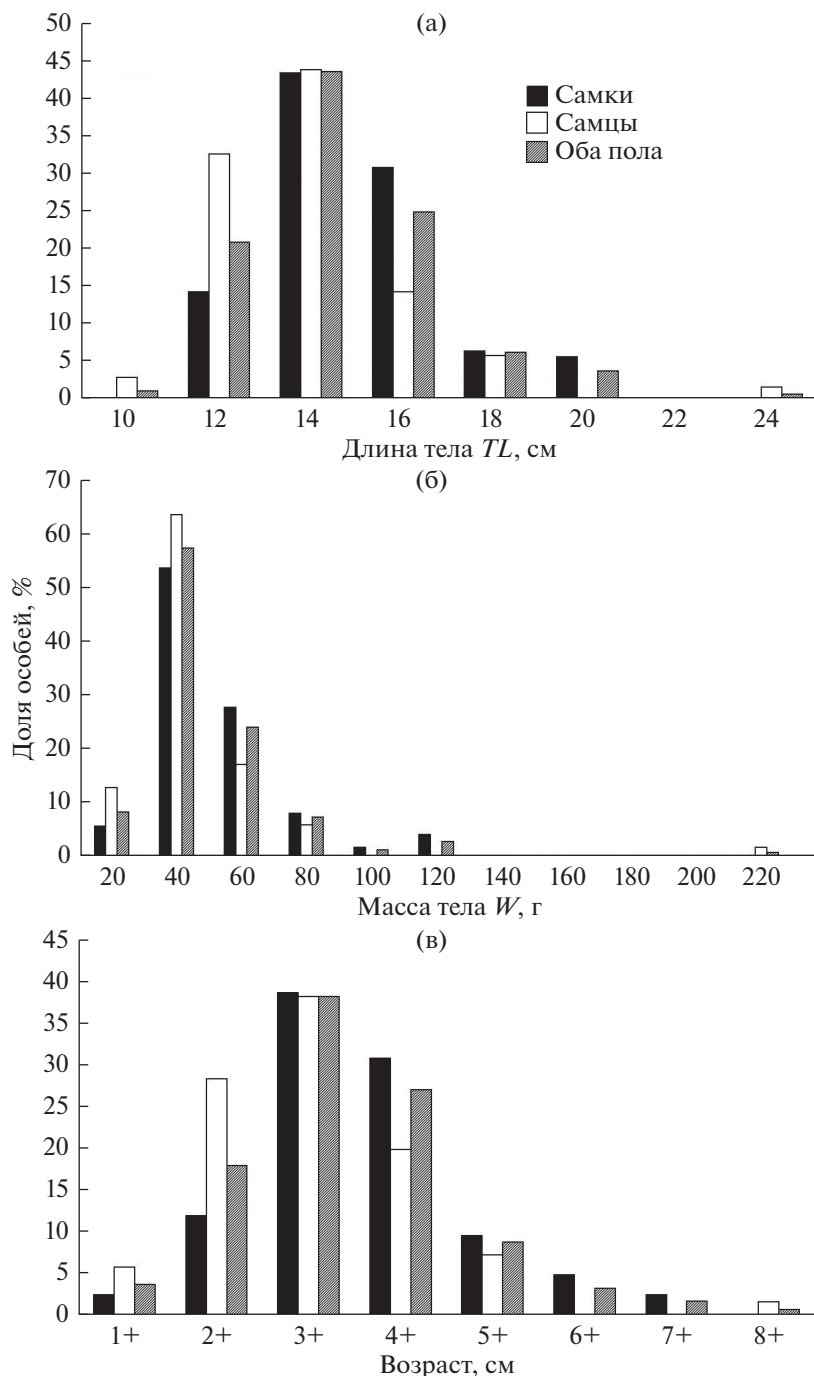


Рис. 4. Линейные размеры (а), масса (б) и возраст (в) половозрелой части уловов *Arius maculatus* из эстуария р. Хау.

Рост *A. maculatus*, согласно эмпирическим данным, условно можно разделить на два этапа (табл. 2). Этап быстрого роста приурочен к первым трем годам жизни до наступления половой зрелости. При достижении 3-летнего возраста (длина тела 13 см, масса тела 21 г) начинается половое созревание, которое знаменует начало второго этапа. Этот этап характеризуется линейно замедляющимся ростом и аллометрическим набором мас-

сы (в уравнении зависимости массы тела от длины  $b = 3.19$  у самок и  $b = 3.12$  у самцов). Созревание самок и самцов завершается при длине 18 см в возрасте 6 лет.

Функция Форда–Уолфорда (Walford, 1946) наблюденных значений длины для обоих полов имеет следующий вид:  $L_{(t+1)} = 0.79L(t) + 4.75$  (регрессия статистически значима,  $F$ -критерий,  $p < 0.05$ ), а ее значение в точке пересечения с прямой  $L_{(t+1)} = L_t$



**Таблица 2.** Линейные размеры и масса отдельных возрастных групп *Arius maculatus* из эстуария р. Хау согласно полученным данным

Возраст, лет	Самцы			Самки		
	$TL \pm SE$ , см	$W \pm SE$ , г	$n$	$TL \pm SE$ , см	$W \pm SE$ , г	$n$
2	11.09 ± 0.13	12.68 ± 0.51	79	11.05 ± 0.13	12.99 ± 0.43	71
3	13.03 ± 0.14	21.24 ± 0.88	49	12.99 ± 0.15	20.94 ± 0.94	44
4	14.60 ± 0.16	31.07 ± 1.13	35	14.75 ± 0.12	31.72 ± 1.02	57
5	15.77 ± 0.28	40.21 ± 2.39	15	16.34 ± 0.15	44.09 ± 1.59	40
6	18.02 ± 0.92	58.18 ± 6.50	5	18.40 ± 0.33	64.03 ± 4.33	12
7	—	—	—	19.92 ± 0.47	83.98 ± 8.01	6

Примечание.  $TL$  – длина тела;  $W$  – масса тела;  $n$  – количество особей; “—” – нет данных.

**Таблица 3.** Параметры роста *Arius maculatus* из эстуария р. Хау

Пол	$L_{\infty}$ , см	$k$ /год	$W_{\infty}$ , г	$a$	$b$	$t_0$ , год	$\phi$	$\phi'$
Самки	25.94	0.18	185	0.0057	3.19	–0.81	2.08	0.77
Самцы	23.72	0.20	111	0.0058	3.12	–0.91	2.05	0.66
Оба пола (эмпирические данные)	28.27	0.15	255	0.0054	3.22	–1.03	2.08	0.78
Оба пола (обратные расчисления)	22.64	0.23	125	0.0054	3.22	–0.55	2.07	0.76

Примечание.  $L_{\infty}$ ,  $W_{\infty}$ ,  $k$  и  $t_0$  – коэффициенты уравнений Берталанфи;  $a$  и  $b$  – параметры зависимости массы от длины:  $W = aTL^b$ ;  $\phi$  – индекс линейного роста;  $\phi'$  – индекс роста массы.

близко к расчетным  $L_{\infty}$  и составляет 22.58 см, что указывает на высокую достоверность аппроксимации эмпирической кривой роста уравнением Берталанфи (табл. 3).

В соответствии с коэффициентами уравнения Берталанфи к возрасту 8–9 лет и самцы, и самки достигают 80% предельной длины. Согласно эмпирическому правилу (Pauly et al., 1988), средняя максимальная длина составляет 95% от  $L_{\infty}$ , т.е. 24 см для самок и 22 см для самцов, а предельный возраст для обоих полов составляет 15 лет. Средние значения расчисленных длин в возрастных группах оказались несколько ниже, чем эмпирических (рис. 5); расхождение в моделях объясняется влиянием феномена Ли (Рикер, 1979). При этом индекс роста  $\phi$  в обоих случаях практически не различается.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ распределения пятнистого сома *Arius maculatus* в изучаемом регионе показал, что это эстуарный резидент, не совершающий протяженных миграций и избегающий сильно опресненных районов. Однако не исключены локальные перемещения рыб в пределах эстуария и морских прибрежных вод, особенно во время сезона дождей.

Определение возраста тропических рыб, как правило, связано с трудностями. Воды низких широт характеризуются постоянством темпера-

турных условий, поэтому тропические виды в течение года растут достаточно равномерно. Однако в отдельных случаях рост тропических рыб в течение года может определяться чередованием сухого сезона и сезона дождей, когда изменяются гидрологические и трофические условия (Henderson, 2005). Чередование периодов высокого и низкого темпов роста у рыб, чувствительных к этим изменениям, закономерно отражается на регистрируемых возраст структурах. Годовая цикличность в данном случае позволяет интерпретировать границу между зонами роста на отолите как годовое кольцо. Например, Фабр и Сен-Поль (Fabr , Saint-Paul, 1998) в работе о биологии амазонской анастомиды *Schizodon fasciatus* отмечают, что годовое кольцо на чешуе у этого вида формируется в течение января–февраля. Максимальный темп роста в данном случае приходится на сухой сезон с низким уровнем воды (июль–ноябрь). В речных системах формирование годового кольца характерно для многих амазонских *Cichla*, что также связано с цикличностью гидрологического режима (Jepsen et al., 1999). В водохранилищах, где условия обитания в течение года стабильны, формирование годового кольца у рыб не наблюдается. Как и в приведенных примерах, у *A. maculatus* хорошо выраженные чередующиеся опаловые и гиалиновые зоны на отолитах свидетельствуют о цикличности роста, приуроченной к сезонности гидрологического режима.



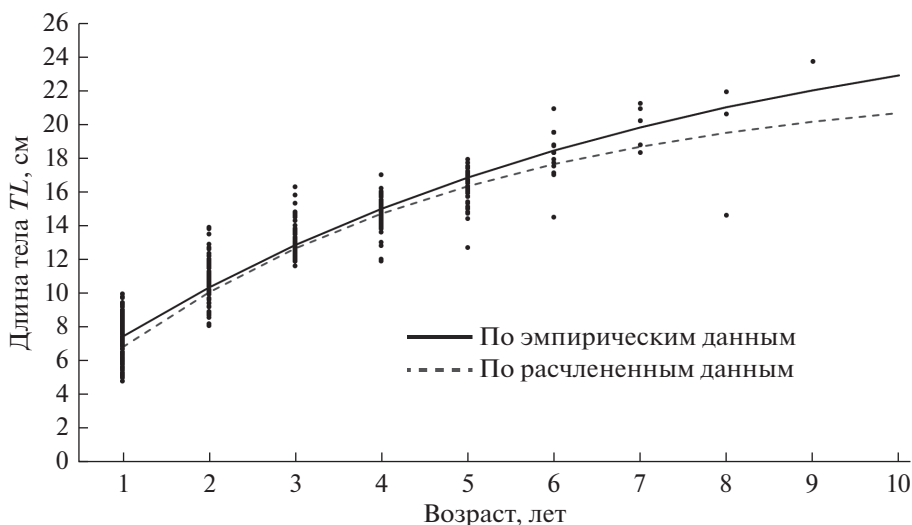


Рис. 5. Кривые линейного роста самок и самцов *Arius maculatus* из эстуария р. Хау, описываемые уравнением Берта-ланфи, по эмпирическим и расчетным данным.

В отличие от многих видов рыб, межполовые различия в росте и сроках созревания у *A. maculatus* не выражены. Возможно, это связано с исключительной ролью самцов в процессе размножения. Они вынашивают икру в ротовой полости и продолжают заботиться о потомстве после завершения эмбрионального развития. Крупные самцы способны обеспечить выживание большего количества потомства, следовательно, увеличение размеров самцов — это адаптивная стратегия, закрепляемая отбором. Некоторые межполовые различия связаны с ростом массы особей старших возрастных групп, что обусловлено преобладающим генеративным ростом самок.

При слабой выраженности полового диморфизма в росте отмечено снижение доли самцов старших возрастных групп в уловах. Это может свидетельствовать о большей смертности самцов или о меньшей доступности для облова. Учитывая заботу о потомстве, характерную для самцов *A. maculatus*, можно предположить, что они предпочитают находиться в укрытиях.

По сравнению с другими популяциями и видами рода *Arius*, обитающий в дельте р. Меконг *A. maculatus* характеризуется низким темпом роста (табл. 4). Это может быть связано с обитанием в эстуарной зоне — акватории с нестабильными гидрологическими условиями, на формирование которых влияют опреснение и изменение терми-

Таблица 4. Параметры роста *Arius maculatus* из разных популяций и некоторых других представителей рода *Arius*

Вид	$L_{\infty}$ , см	$k$ /год	$W_{\infty}$ , г	$a$	$b$	$t_0$ , год	$\phi$	$\phi'$
Эстуарий р. Хау, дельта р. Меконг (наши данные)								
<i>A. maculatus</i>	28.3	0.15	255	0.0054	3.22	-1.03	2.08	0.78
Юго-западное побережье о-ва Тайвань (Chu et al., 2011; Chu et al., 2012)*								
<i>A. maculatus</i>	34.4	0.28	—	0.0150	2.95	-0.57	2.52	—
Яванское море, побережье Индонезии (Velasco, Oddone, 2004)								
<i>A. maculatus</i>	45.0	0.73	—	—	—	—	3.17	—
Гвинея (Conand et al., 1995)*								
<i>A. heudelotii</i>	70.0	0.14	—	—	—	-0.39	2.84	—
<i>A. laticutatus</i>	65.0	0.15	—	—	—	-0.31	2.81	—
<i>A. parkii</i>	61.2	0.17	—	—	—	-0.28	2.81	—
Кувейт (Bawazeer, 1987)								
<i>A. thalassinus</i>	106.4	0.06	—	—	—	-2.10	2.86	—

\*Использовали  $FL$  (длина тела по Смитту); остальные обозначения, как в табл. 3.

ческого режима во время сезона дождей, а также приливо-отливные и сгонно-нагонные явления. Гидрологическая нестабильность приводит к увеличению энергетических трат на водно-солевой обмен или на перемещение в районы с более благоприятным гидрологическим режимом. Какие преимущества получает этот морской по происхождению вид, пребывая в районе с лабильными условиями обитания? Обитая в хорогалинной зоне, пятнистый сом, вероятно, избегает конкуренции и/или давления хищников из прибрежной акватории моря, где биологическое разнообразие несравненно выше. Низкий темп роста компенсируется меньшей смертностью, что позволяет поддерживать репродуктивный потенциал. Освоение опресненных акваторий, направление и интенсивность отбора в которых отличаются от таковых в морском побережье, может привести к филогенетическому сдвигу и формообразованию.

Полученные сведения о биологии *A. maculatus* из дельты р. Меконг в сухой сезон могут стать отправной точкой в мониторинге состояния его популяции. Существенный интерес представляет изучение распределения и биологии *A. maculatus* в период сезона дождей. Это позволит установить миграционную активность и степень связи представителей эстуарной и морской прибрежной зон.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа подготовлена в рамках темы Эколан Э-3.4 “Влияние климатических изменений и антропогенных факторов на экосистемы нижнего течения р. Меконг” и государственного задания ФИЦ ИнБЮМ “Закономерности формирования и антропогенная трансформация биоразнообразия и биоресурсов Азово-Черноморского бассейна и других районов Мирового океана” (№ АААА-А18-118020890074-2).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Болтачев А.Р., Карпова Е.П., Статкевич С.В. и др. Особенности количественного распределения рыб и десятиногих ракообразных в дельте реки Меконг в межсезонный период 2018 г. // Мор. биол. журн. 2018. Т. 3. № 4. С. 14–28.

Мина М.В., Клевезаль Г.А. Рост животных. М.: Наука. 1976. 291 с.

Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб. М.: Пищ. пром-ть. 1966. 391 с.

Рикер У.Е. Методы оценки и интерпретация биологических показателей популяций рыб. М.: Пищ. пром-ть. 1979. 408 с.

Серов Д.В. Полевой определитель пресноводных рыб Южного Вьетнама. М.: Наука. 1994. 94 с.

Bawazeer A.S. The fishery management of the stock of chim, the giant sea catfish *Arius thalassinus* in Kuwait waters // Kuwait Bull. Mar. Sci. 1987. V. 9. P. 87–100.

Chea R., Lek S., Ngor P., Grenouillet G. Large-scale patterns of fish diversity and assemblage structure in the longest tropical river in Asia // Ecol. Freshwater Fish. 2017. V. 26. № 4. P. 575–585.

Chu W.-S., Hou Y.-Y., Ueng Y.-T. et al. Estimates of age, growth and mortality of spotted catfish, *Arius maculatus* (Thunberg, 1792), off the Coast of Yunlin, Southwestern Taiwan // Afr. J. Biotechnol. 2011. V. 10. № 66. P. 15416–15421.

Chu W.-S., Hou Y.-Y., Ueng Y.-T., Wang J.-P. Correlation between the length and weight of *Arius maculatus* off the southwestern coast of Taiwan // Braz. Arch. Biol. Technol. 2012. V. 55. № 5. P. 705–708.

Conand F., Camara S.B., Domain F. Age and growth of three species of Ariidae (Siluriformes) in coastal waters of Guinea // Bull. Mar. Sci. 1995. V. 56. № 1. P. 58–67.

Fabré N.N., Saint-Paul U. Annulus formation on scales and seasonal growth of the Central Amazonian anastomid *Schizodon fasciatus* // J. Fish Biol. 1998. V. 53. P. 1–11.

Henderson P.A. The growth of tropical fishes // Fish Physiol. 2005. V. 21. P. 85–100.

Jepsen D.B., Winemiller K.O., Taphorn D.C., Rodrigues Olarte D. Age structure and growth of peacock cichlids from rivers and reservoirs of Venezuela // J. Fish Biol. 1999. V. 55. P. 433–450.

Johdal M.S., Esmaili H.R., Tandon K.K. A comparison of back-calculated lengths of silver carp derived from bony structures // J. Fish Biol. 2001. V. 59. № 6. P. 1483–1493.

Mazlan A.G., Abdullah S., Shariman M.G., Arshad A. On the biology and bioacoustic characteristic of spotted catfish *Arius maculatus* (Thunberg 1792) from the Malaysian Estuary // Res. J. Fish. Hydrobiol. 2008. V. 3. P. 63–70.

Pauly D., Moreau J., Prein M. A comparison of overall growth performance of tilapia in open waters and aquaculture // Pullin R.S.V., Bhukaswan T., Tonguthai K. and Maclean J.L. (eds). The Second International Symposium on Tilapia in Aquaculture. ICLARM Conference Proceedings. Bangkok: Dep. Fish., 1988. V. 15. P. 469–479.

Rainboth W.J. Fishes of the Cambodian Mekong / FAO Species Identification Field Guide for Fishery Purposes. Rome: FAO. 1996. 265 p.

Russell B.C., Houston W. Offshore fishes of the Arafura Sea // Beagle, Rec. North. Territ. Mus. Arts Sci. 1989. V. 6. P. 69–84.

Tran D.D., Shibukawa K., Nguyen T.P. et al. Fishes of the Mekong Delta, Vietnam. Can Tho, Vietnam: Can Tho Univ. Publishing House. 2013. 174 p.

- Valbo-Jørgensen J., Coates D., Hortle K.* Chapter 8 – Fish diversity in the Mekong River basin // *The Mekong: Biophysical Environment of an International River Basin*. New York: Academic Press. 2009. P. 161–196.
- Velasco G., Oddone M.C.* Growth parameters and growth performance indexes for some populations of marine catfishes (Actinopterygii, Siluriformes, Ariidae) // *Acta Biol. Leopold.* 2004. V. 28. P. 307–313.
- Von Bertalanffy L.* A quantitative theory of organic growth (Inquiries on growth laws. II) // *Human Biol.* 1938. V. 10. P. 181–213.
- Walford L.A.* A new graphic method of describing the growth of animals // *Biol. Bull.* 1946. V. 90. № 2. P. 141–147.
- Wassmann R., Hien N.X., Hoanh C.T., Tuong T.P.* Sea level rise affecting the Vietnamese Mekong Delta: water elevation in the flood season and implications for rice production // *Clim. Change.* 2004. V. 66. № 1–2. P. 89–107.
- Ziv G., Baran E., Nam S. et al.* Trading-off fish biodiversity, food security, and hydropower in the Mekong River Basin // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012. V. 109. № 15. P. 5609–5614.

## The Size–Age Structure, Growth, and Maturation of the Spotted Catfish *Arius maculatus* (Thunberg, 1792) (Siluriformes: Ariidae) from the Mekong Delta, Vietnam

D. N. Kutsyn<sup>a, b, c</sup>, E. R. Ablyazov<sup>a, b, c</sup>, Ba Hai Truong<sup>c</sup>, and Nguyen Dinh Cu<sup>c</sup>

<sup>a</sup>*A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol 299011, Russia*

<sup>b</sup>*A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow 119071, Russia*

<sup>c</sup>*Southern Department, Joint Vietnamese–Russian Tropical Research and Technological Center, Ho Chi Minh City, Vietnam*

The size–age structure, growth, and maturation of the spotted catfish *Arius maculatus* (Thunberg, 1792) from the Hau River estuary (Mekong Delta, Vietnam) were studied for the first time. A total of 460 fish specimens collected from January to March 2019 were examined. The annuli on the otoliths were visualized; their formation may be related with the alternation of dry and rainy seasons. The males to females ratio in catches was 1 : 1.81. The proportion of males decreased in the older age groups. The maximum total body length of females was 21.9 cm; males, 23.7 cm. The maximum recorded age of females in catches was 7+; males, 8+. No inter-gender differences in growth were detected. The parameters of the von Bertalanffy equation for both sexes according to empirical data were as follows:  $L_{\infty} = 28.3$  cm;  $k = 0.15 \text{ yr}^{-1}$ ;  $t_0 = -1.03$  yr; growth performance index,  $\phi = 2.08$ . The coefficients of relationship between mass and length were as follows:  $a = 0.0054$ ;  $b = 3.22$ . Maturation began at  $TL = 13$  cm at age 3 yr and ended at  $TL = 18$  cm at age 6 yr; 50% of individuals became mature at  $TL = 15$  cm at age 4 yr. No inter-gender differences in the timing of maturation were found. *A. maculatus* from the Mekong Delta is characterized by a low growth rate compared to other populations, which may be associated with the labile habitat conditions in the estuary zone.

*Keywords:* spotted catfish, *Arius maculatus*, age, growth, maturation, Mekong River, delta, estuary

УДК 599.745.3

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДИСТАНЦИОННОГО НАБЛЮДЕНИЯ ДЛЯ МОНИТОРИНГА СОСТОЯНИЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ ГРУППИРОВКИ ЛАРГИ *PHOCA LARGHA* PALLAS, 1811 В ЗАЛИВЕ ПЕТРА ВЕЛИКОГО ЯПОНСКОГО МОРЯ

© 2021 г. И. О. Катин<sup>1</sup>, \*, В. А. Нестеренко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН,  
Владивосток 690041, Россия

<sup>2</sup>Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН,  
Владивосток 690022, Россия

\*e-mail: katinpelis@gmail.com

Поступила в редакцию 25.12.2019 г.

После доработки 25.03.2020 г.

Принята к публикации 29.09.2020 г.

В Дальневосточном морском заповеднике (зал. Петра Великого Японского моря) для мониторинга состояния территориальной группировки ларги *Phoca largha* Pallas, 1811 в зоне репродукции разработан и установлен автономный комплекс дистанционной аудио-видеорегистрации активности морских млекопитающих, позволяющий получать информацию о животных, не оказывая влияния на их естественное поведение.

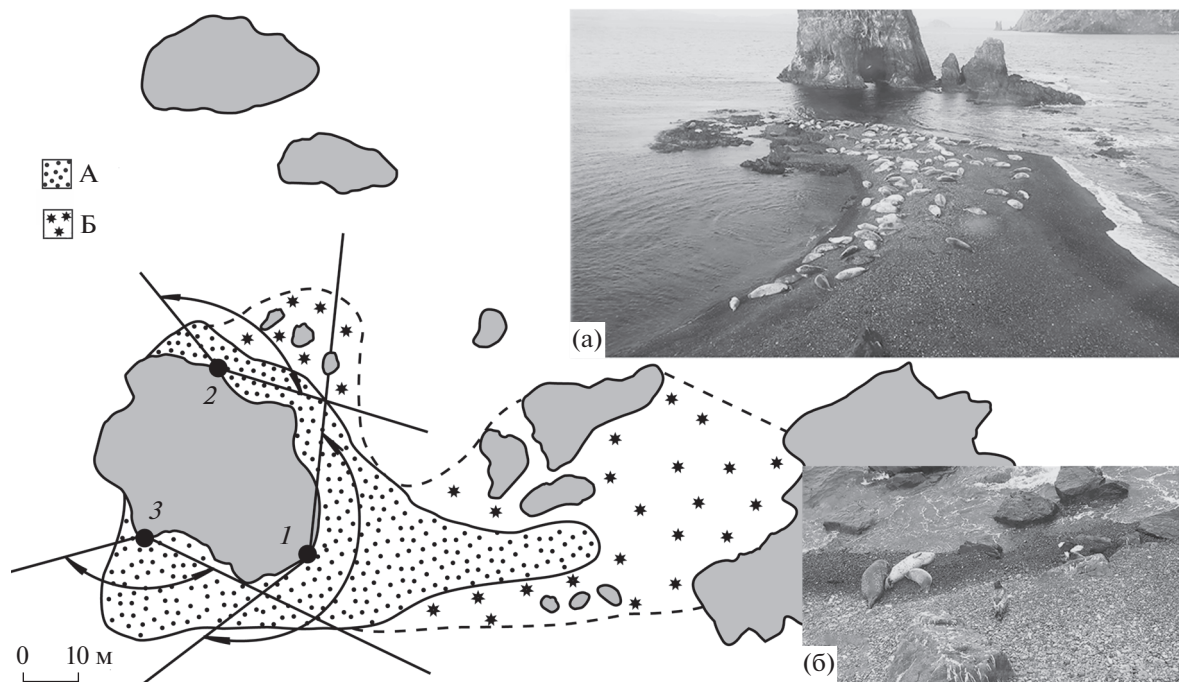
**Ключевые слова:** ларга, *Phoca largha*, мониторинг, видео-регистрация, залив Петра Великого

**DOI:** 10.31857/S0134347521010046

В границах обширного ареала ларги *Phoca largha* Pallas, 1811 существует восемь репродуктивных концентраций (Shaughnessy, Fay, 1977), в которых проходят массовые роды и выкармливание детенышей. Южный популяционный сегмент (Boveng et al., 2009) объединяет две генетически близкие (O'Soggy-Crowe et al., 2001) и крайне малочисленные (суммарно не более 4000 особей) территориальные группировки Японского и Желтого морей, внесенные в ESA (Акт о видах, находящихся под угрозой). Уникальность репродуктивно изолированной группировки ларги южной части Японского моря состоит в том, что исторически сложившейся нормой для обитающих здесь тюленей является береговое размножение на островных лежбищах в зал. Петра Великого (Катин, Нестеренко, 2010). Для выкармливания детенышей в заливе пригодны лишь острова архипелага Римского-Корсакова, обладающие определенными геоморфологическими характеристиками (Катин, Нестеренко, 2010). По счастливой случайности, эта группа островов оказалась под охраной созданного в 1978 г. Дальневосточного морского заповедника, что сыграло ключевую роль для выживания ларги в зал. Петра Великого в условиях возрастающего негативного антропогенного влияния. В настоящее время за-

поведник несет ответственность за судьбу всей репродуктивной группировки ларги Японского моря и, соответственно, обязан проводить мониторинг состояния популяции этого вида для своевременного выявления негативных трендов ее динамики.

Традиционные методы слежения за ластоногими, нацеленные преимущественно на подсчет особей, к сожалению, не позволяют получить достаточный объем информации, необходимый для корректного экологического анализа, а в большинстве случаев предполагают ту или иную степень вмешательства наблюдателей в происходящие на лежбищах биологические процессы. Беспокорство тюленей в период родов и выкармливания детенышей негативно сказывается на кормящих самках и в конечном итоге может отразиться на выживаемости сеголетков. В пре- и постмиграционный периоды, когда на ограниченном количестве лежищ береговые объединения тюленей состоят из сотен особей, слежение за ними становится практически невозможным из-за высокого уровня беспокойства животных: при любой попытке исследователей приблизиться к лежищу тюлени массово сходят в воду. В этой ситуации не удается не только от-



**Рис. 1.** Расположение видеокамер (1–3) удаленного комплекса дистанционного наблюдения на о-ве Кентавр в зал. Петра Великого Японского моря; скриншоты с камер от 06.11.2018 г. (а) и 12.03.2019 г. (б). Условные обозначения: А – аккумулятивный мелкофракционный пляж; Б – зона ледового припая.

метить особенности поведения животных, но и подсчитать их количество.

Оптимальным решением проблемы стали разработка и реализация программы дистанционного слежения, что позволяет исключить влияние присутствия наблюдателей на естественное поведение тюленей. Широко используемая в мире для наблюдения за разными видами животных методика фото- и видеолушек имеет ряд ограничений, главным образом это невозможность получения прямых наблюдений за животными в режиме on-line. Дистанционное видеослежение предоставляет гораздо больше информации. Первые дистанционные видеокамеры были установлены и успешно использованы в США на лежбищах сивуча на о-ве Чизвелл (Аляска) в 1998 г. (Maniscalco et al., 2002), а в России на мысе Козлова (Камчатка) в 2001 г. (Бурдин и др., 2002; Усатов и др., 2014). Однако в репродуктивный период изучать ларгу с помощью этого метода было невозможно, так как на большей части ареала она размножается на льдах. И даже при изучении ларги, размножающейся на берегу, на удаленных от материка островных лежбищах использование данного метода стало доступным только в последние годы с появлением новых технологий.

Изучение репродуктивной группировки ларги в зал. Петра Великого ведется с 1996 г. (Катин, 2006). За это время удалось выяснить, что наиболее удобным местом для слежения за тюленями в

репродуктивный период является островная система Кентавр ( $42^{\circ}39.545\text{ N}$ ,  $131^{\circ}26.685\text{ E}$ ), которая включает остров и два кекура, находящихся в проливе между островами Большой Пелис и Матвеева архипелага Римского-Корсакова. Покрытый почвой и растительностью остров площадью  $40 \times 20\text{ м}$  соединен с одним из кекуров пересыпью (рис. 1), стороны которой ориентированы на юго-запад и северо-восток. Пляж пересыпи шириной до 30 м и длиной до 80 м состоит из разноразмерной гальки, булыжников и песка. Площадь пляжа изменяется от  $2500\text{ м}^2$  в периоды максимальной аккумуляции грунта на штранде до  $1000\text{ м}^2$  после происходящего при сильных штормах перемещения грунта. Здесь расположено лежбище “Кентавр” (Нестеренко, Катин, 2014).

Тюлени используют всю территорию пляжа и прилегающие рифы в проливах между островом и кекурами на акватории площадью около  $3000\text{ м}^2$ . При круглогодичном использовании лежбища на нем поэтапно формируются береговые объединения ларги нескольких типов (Катин, Нестеренко, 2010). В прелиминарных объединениях концентрируются вернувшиеся из миграций животные; в репродуктивных объединениях проходят роды и выкармливание детенышей. По мере завершения периода репродукции формируются предшествующие началу миграции береговые объединения, названные линными из-за совпадения их существования с периодом линьки тюленей. В летнее

время в заливе и в конечных местах миграций тюленей функционируют восстановительные объединения. Характерный уровень численности береговых объединений — это выведенный в результате многолетних наблюдений количественный показатель, отражающий емкость лежбища (Нестеренко, Катин, 2009). На лежбище “Кентавр” характерный уровень численности животных в прелиминарных объединениях составляет 200 особей, в линных — 150, в восстановительных — 10. Ежегодно здесь рождается до 15 детенышей (Нестеренко, Катин, 2014).

В октябре 2018 г. было установлено оборудование для видеорегистрации активности морских млекопитающих, состоящее из двух комплектов. Базовый комплект не требует присутствия оператора и представляет собой сервер с внешними жесткими дисками, каналами выхода в Интернет и Wi-Fi точки доступа для связи с удаленными устройствами.

Смонтированный на о-ве Кентавр удаленный комплект — это набор видеокамер, микрофонов, управляющих устройств, системы автономного электропитания и каналобразующего оборудования для передачи аудио- и видеoinформации на базовый комплект, размещенный на соседнем о-ве Большой Пелис. Мы использовали две видеокамеры с фиксированными объективами и дальностью инфракрасной подсветки 50 м, а также одну высокоскоростную поворотную ( $360^\circ$  в горизонтальной плоскости и  $100^\circ$  в вертикальной плоскости) видеокамеру с 30-кратным оптическим и 360-кратным цифровым увеличением и дальностью инфракрасной подсветки 150 м; выносной внешний направленный микрофон, совмещенный с аудиоканалом поворотной камеры и направленной Wi-Fi точкой доступа на кронштейне. Кроме этого в состав удаленного комплекта входили две панели солнечных батарей с контроллером заряда аккумуляторов; аккумуляторный блок общей емкостью 320 а/ч; модуль управления вторичного электропитания и коммутации (выполнен в виде законченного устройства в ударопрочном влагозащищенном кейсе с установленными на нем герметичными разъемами, снабжен системами контроля температуры и принудительной вентиляции), включающий GSM управление системой и контроль ее состояния с мобильных устройств. Камеры установлены так, что позволяют держать под наблюдением 90% используемой тюленями береговой площади.

После передачи на базовый комплект информация через сеть Дальневосточного отделения РАН поступает во внешний Интернет. Полнофункциональный удаленный контроль и управление системой можно осуществлять с любых устройств с предустановленной специальной программой, включая смартфон. По сравнению с ранее использовавшимся оборудованием для дистанционной видеорегистрации тюленей (Burdin

et al., 2009) у нас появились новые технологические возможности. Самыми значимыми являются полноценный контроль и управление системой (включение-выключение, поворот и зуммирование камер) из любой точки глобальной сети. Важно и то, что система является необслуживаемой, а ее технические характеристики позволяют вести наблюдения круглосуточно и круглогодично.

Работа камер с октября 2018 г. до ноября 2019 г. была протестирована во все сезоны. Получены данные по функционированию береговых объединений ларги в течение годового цикла. Технические сбои в работе системы не выявлено. Общий объем видеоматериала составил более 16 ТБ. После расшифровки видеозаписей ранее неизвестные аспекты жизнедеятельности ларги станут предметом детального научного анализа.

Сбор и обработка материала не закончены, поэтому обсуждение полученных результатов пока преждевременно. Однако можно отметить следующее. Впервые проведено наблюдение за 11 родами и выкармливанием новорожденных (30 ч видеослежения), а также за основными процессами при переходе детенышей к самостоятельной жизни. Пролеслено функционирование девяти семейных триад на протяжении всего периода их существования. Получена полная видеозапись семи спариваний как в воде, так и на берегу. Информация о том, как у конкретной особи в реальном времени происходит тот или иной биологический процесс, является самым ценным результатом видеослежения. Записана вокализация тюленей разных пола и возраста, синхронизированная с видеорядом. Персонализированное отслеживание животных, которое проводилось по меченым особям и тюленям с естественными метками (особенности окраски, шрамы и прочее), наряду с регистрацией суточного и сезонного изменения количественного состава тюленей на лежбище позволит проанализировать динамику изменения индивидуального состава береговых объединений. Накоплен массив информации, достаточный для начала работы по цифровой паспортизации животных.

По мере накопления материала предполагается определить особенности формирования и распада прелиминарного берегового объединения, специфику поведения в нем особей разного пола и возраста, провести этологический анализ линного берегового объединения для выявления индивидуальных дистанций и особенностей протекания линьки у животных разного возраста.

Немаловажно и то, что установленная видеосистема позволяет получить материал по динамике окружающей среды. Успешно осуществляется наблюдение за птицами, прежде всего экологически связанными с ларгой в период репродукции (орланами, воронами, чайками), а также за процессами льдообразования, динамикой субстрата

и другими океанологическими характеристиками, важными для функционирования береговых объединений ларги на лежбище.

Таким образом, дистанционная система видеонаблюдения позволила получить уникальные сведения об особенностях экологии береговой формы ларги, которые необходимы для мониторинга состояния популяции. Для дальнейшего расширения программы планируется увеличить количество точек наблюдения и использовать беспилотные летательные аппараты для слежения за тюленями.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую признательность всем, кто принимал участие в реализации идеи использования дистанционного наблюдения в ходе мониторинга состояния репродуктивной группировки ларги. Особую благодарность приносим администрации Дальневосточного морского заповедника, его бывшему директору Н.А. Якушевскому и инспектору С.Г. Минову, а также ООО “Кордон-Информ” и его директору Н.М. Гетману.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бурдин А.М., Лисицина Т.Ю., Бурканов В.Н. и др. Исследование биологии сивуча (*Eumetopias jubatus*) на м. Козлова (Кроноцкий заповедник, Камчатка) с использованием дистанционной видеосистемы в 2001 г. // Морские млекопитающие Голарктики:

Сб. тр. по материалам Второй междунаrod. конф. (Байкал, Россия, 10–15 сентября 2002 г.). Москва. 2002. С. 53.

Катин И.О. Ларга залива Петра Великого Японского моря (характеристика и использование лежбищ, состояние популяции): Дис. ...канд. биол. наук. Владивосток: ДВО РАН; БПИ. 2006. 146 с.

Катин И.О., Нестеренко В.А. Океанологические условия и репродукция пятнистой нерпы (*Phoca largha*) в заливе Петра Великого Японского моря // Океанология. 2010. Т. 50. № 1. С. 82–88.

Нестеренко В.А., Катин И.О. Лежбище: объем понятия, порядок установления // Экология. 2009. № 1. С. 53–59.

Нестеренко В.А., Катин И.О. Ларга (*Phoca largha*) в заливе Петра Великого. Владивосток: Дальнаука. 2014. 219 с.

Усатов И.А., Алтухов А.В., Бурканов В.Н. Сезонная динамика численности сивуча на репродуктивном лежбище у м. Козлова, Камчатка // Сохранение биоразнообразия Камчатки и прилегающих морей: Материалы XV науч. конф. Петропавловск-Камчатский: Камчатпресс. 2014. С. 372–376.

Boveng P.L., Bengtson J.L., Buckley T.W. et al. Status review of the spotted seal (*Phoca largha*) // NOAA Technical Memorandum NMFS-AFSC-200. Washington, DC: U.S. Department of Commerce. 2009. 146 p.

Burdin A.M., Hennen D.R., Calkins D.G. et al. Can we see a cohort effect on survival of Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*) at Kozlova Cape rookery (eastern Kamchatka, Russia)? // Mar. Mamm. Sci. 2009. V. 25. № 4. P. 888–901.

Maniscalco J., Atkinson S., Armato P. Early maternal care and pup survival in Steller sea lions: a remote video monitoring project in the Northern Gulf of Alaska // Arct. Res. U.S. 2002. V. 16. P. 36–41.

O’Corry-Crowe G., Lowry L.F., Burkanov V.N. et al. The biogeography and population structure of spotted seals (*Phoca largha*) using mitochondrial DNA // 14th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. Vancouver Canada, November 28 – December 3, 2001. P. 159.

Shaughnessy P.D., Fay F.H. A review of the taxonomy and nomenclature of North Pacific harbour seals // J. Zool. 1977. V. 182. P. 385–419.

## The Use of a Remote Surveillance System for Monitoring the Reproductive Grouping of the Spotted Seal *Phoca largha* Pallas, 1811 in Peter the Great Bay, Sea of Japan

I. O. Katin<sup>a</sup> and V. A. Nesterenko<sup>b</sup>

<sup>a</sup>A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

<sup>b</sup>Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690022, Russia

An autonomous system of remote audio and video surveillance of marine mammals’ activity has been designed and installed in the Far Eastern Marine Biosphere Nature Reserve (Peter the Great Bay, Sea of Japan) for monitoring the condition of the spotted seal (*Phoca largha* Pallas, 1811) population in the reproductive zone. This system makes it possible to collect information on animals without affecting their natural behavior.

**Keywords:** spotted seal, *Phoca largha*, monitoring, video surveillance, Peter the Great Bay



УДК 597.35.591.9

## ПЕРВОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ НЕРЕСТИЛИЩА СКАТА ТАРАНЦА *BATHYRAJA TARANETZI* (DOLGANOV, 1983) И ФИОЛЕТОВОГО СКАТА *B. VIOLACEA* (SUWOROV, 1935) В ТИХООКЕАНСКИХ ВОДАХ СЕВЕРНЫХ КУРИЛЬСКИХ ОСТРОВОВ

© 2021 г. А. А. Баланов<sup>1</sup>, \*, В. В. Панченко<sup>1</sup>, А. Б. Савин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Национальный научный центр морской биологии им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток 690041, Россия

<sup>2</sup>Тихоокеанский филиал Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии (ТИНРО), Владивосток 690091, Россия

\*e-mail: abalanov@imb.dvo.ru

Поступила в редакцию 16.09.2019 г.

После доработки 29.01.2020 г.

Принята к публикации 30.01.2020 г.

Сообщается о первом обнаружении нерестилища ската Таранца *Bathyrāja taranetzi* и фиолетового ската *Bathyrāja violacea* в тихоокеанских водах северных Курильских островов в координатах 50°25'7" с.ш., 157°22'7" в.д. на глубине 350–351 м при температуре воды 3.8°C. На нерестилище отмечено большое количество яйцевых капсул и недавно вылупившейся молоди скатов обоих видов.

**Ключевые слова:** *Bathyrāja taranetzi*, *Bathyrāja violacea*, нерестилище, яйцевая капсула, размеры, о-в Парамушир

**DOI:** 10.31857/S0134347520060029

Для скатов характерно внутреннее оплодотворение. После спаривания сперма может храниться в организме самки продолжительное время. Оплодотворение яиц происходит по мере их высвобождения из яичника; в половых путях самки оплодотворенные яйцеклетки инкапсулируются и остаются до момента откладки. Период эмбрионального развития у скатов может быть довольно продолжительным, у разных видов североатлантических скатов он длится от двух до восьми месяцев (Wourms, 1977). Согласно экспериментальным данным, у *Raja eglanteria* при постоянной температуре 20°C потомство вылупляется в среднем через 12 нед. (Lueg et al., 2007). У размножающихся в тихоокеанских водах на материковом склоне видов скатов эмбрионы развиваются при гораздо меньшей слабopоложительной температуре (Hoff, 2010; Hunt et al., 2011), что приводит к увеличению продолжительности эмбрионального развития. Так, у щитоносного ската *Bathyrāja parmifera* в восточной части Берингова моря период эмбрионального развития составляет 3.5 года, поэтому на нерестилищах одновременно могут встречаться три когорты развивающихся эмбрионов, которые были отложены преимущественно летом (Hoff, 2008). Скаты рода *Bathyrāja* обычно нерестятся на покрытых мягким грунтом или ка-

менистых участках подводных хребтов, расположенных в высокопродуктивных зонах и с циркуляцией водных масс, благоприятной для развития находящихся в яйцевых капсулах эмбрионов (Hoff, 2008, 2010, 2019; Hunt et al., 2011).

Высокобореальный тихоокеанский вид скат Таранца *Bathyrāja taranetzi* и широкобореальный преимущественно приазиатский вид фиолетовый скат *B. violacea* широко распространены в северо-западной части Тихого океана (Mecklenburg et al., 2002; Parin et al., 2014). В настоящее время на внешнем крае шельфа, а также в верхнем отделе материкового склона северных Курильских островов и юго-восточной Камчатки среди скатов по биомассе и численности доминирует фиолетовый скат, а скат Таранца является субдоминантным видом (Savin et al., 2019). Опубликованы сведения о распределении и биологии данных видов скатов в северо-западной части Тихого океана (Orlov et al., 2006; Orlov, Tokranov, 2010; Григоров и др., 2017, и др.). Однако информация о местах и сроках их нереста в этих районах отсутствует, хотя известны некоторые аспекты репродуктивной биологии ската Таранца в восточной части Берингова моря (Ebert, 2005). В настоящей работе впервые описано нерестилище ската Таранца и фиолетового ската, обнаруженное в тихоокеан-

ских водах о-ва Парамушир (северные Курильские острова).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для работы послужили данные, собранные авторами во время траловой съемки внешнего шельфа и верхнего отдела склона, прилегающих к тихоокеанской стороне северной части Курильской гряды и юга Камчатки (рис. 1). Исследования проведены на судне ТИНРО НИС “Профессор Леванидов” 23.08–10.09.2018 г. и включали 86 тралений донным тралом ДТ/ТМ-27.1/24.4 м на глубинах 120–952 м. Методика работ и расчетов подробно изложена нами в предыдущей публикации (Savin et al., 2019).

Всего за время исследований отмечено и промерено (*TL*) 587 экз. ската Таранца, а также поймано 922 экз. фиолетового ската, из них промерено 672 экз. В уловах отмечали присутствие яйцевых капсул обоих видов (далее – капсулы) и определяли их состояние; общее количество и соотношение разных групп капсул не подсчитывали.

Карта распределения построена с помощью программы Surfer.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В период наших исследований оба вида скатов ловились практически по всему исследованному району (рис. 1). Скат Таранца встречался на глубине от 125 до 757 м, фиолетовый скат – от минимальной глубины исследований (120 м) до глубины 586 м. Размерный состав ската Таранца варьировал от 11.3 до 67.5 см, фиолетового ската – от 13.5 до 72.7 см. Массовый улов молоди обоих видов длиной до 30 см отмечен лишь в одном тралении.

Пятого сентября 2018 г. на траверзе о-ва Парамушир было выполнено траление с постановкой на грунт в координатах 50°25'7" с.ш., 157°22'7" в.д. и с выборкой в координатах 50°25'1" с.ш., 157°21'4" в.д. Глубина на месте траления варьировала от 350 м в начале до 351 м в конце траления при придонной температуре воды 3.8°C. За 20 мин лова здесь были пойманы 91 особь ската Таранца и 430 особей фиолетового ската. В пересчете на площадь при применении коэффициента уловистости 0.5 (Savin et al., 2019) плотность ската Таранца на участке траления составила 6044 экз./км<sup>2</sup>, фиолетового ската – 28559 экз./км<sup>2</sup>. В улове скаты обоих видов были представлены молодью сходных размеров. Некоторые мелкоразмерные особи еще имели остатки желточного мешка. Длина ската Таранца варьировала от 14 до 31 см с преобладанием особей длиной до 16 см (рис. 2а). Размеры фиолетового ската варьировали от 14 до 32 см, преобладали особи длиной до 23 см (рис. 2б).

В улове этого траления в большом количестве присутствовали капсулы скатов. Они имели четкие признаки (форма капсулы и рогов, структура оболочек), которые позволили идентифицировать их как капсулы ската Таранца и фиолетового ската (Ebert, 2005; Hoff, 2019). Улов состоял из смеси пустых (“старых” – поврежденных, часто покрытых обрастателями, а также “новых” – с неповрежденной поверхностью и без обрастателей) капсул без яиц или эмбрионов и из полных капсул с яйцами или эмбрионами.

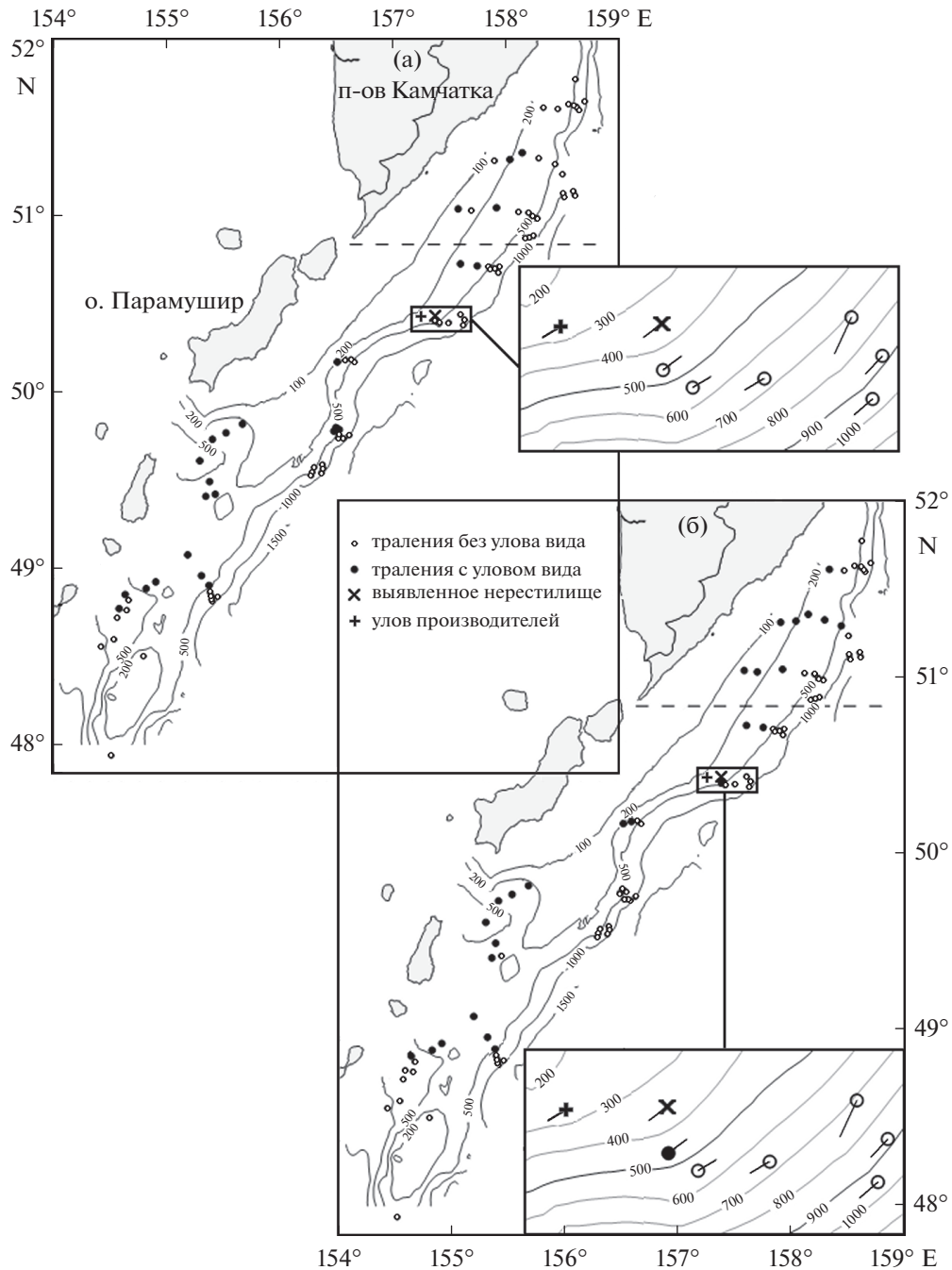
Всего на разрезе (рис. 1), в который входило данное траление, было выполнено восемь тралений с шагом между ними около 100 м. Выше исследованного траления проведен один лов, глубина постановки в котором составляла 251 м, температура – 3.9°C, а ниже выполнено шесть тралений на глубине от 443 до 952 м при температуре 3.7–3.0°C.

Скат Таранца в тралениях, проведенных глубже 350 м, отсутствовал. Фиолетовый скат был обнаружен только в тралении на глубине 443 м, когда были пойманы две особи длиной 30 и 37 см. Между тем на меньшей глубине (251 м) при близкой температуре (3.9°C) улов обоих видов был относительно высоким, а размерный состав скатов значительно отличался от такового на глубине 350 м. За 20 мин лова здесь было поймано 62 экз. ската Таранца длиной 46–66 см (рис. 2а) и 46 экз. фиолетового ската, среди которых были обнаружены особи длиной 53–73 см (рис. 2б).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В тихоокеанских водах Камчатки и северных Курильских островов скат Таранца ранее встречался в батиметрическом интервале 101–700 м, а фиолетовый скат – 101–650 м (Orlov et al., 2006; Orlov, Tokranov, 2010). Данные о нерестилищах обоих видов в опубликованных источниках отсутствуют.

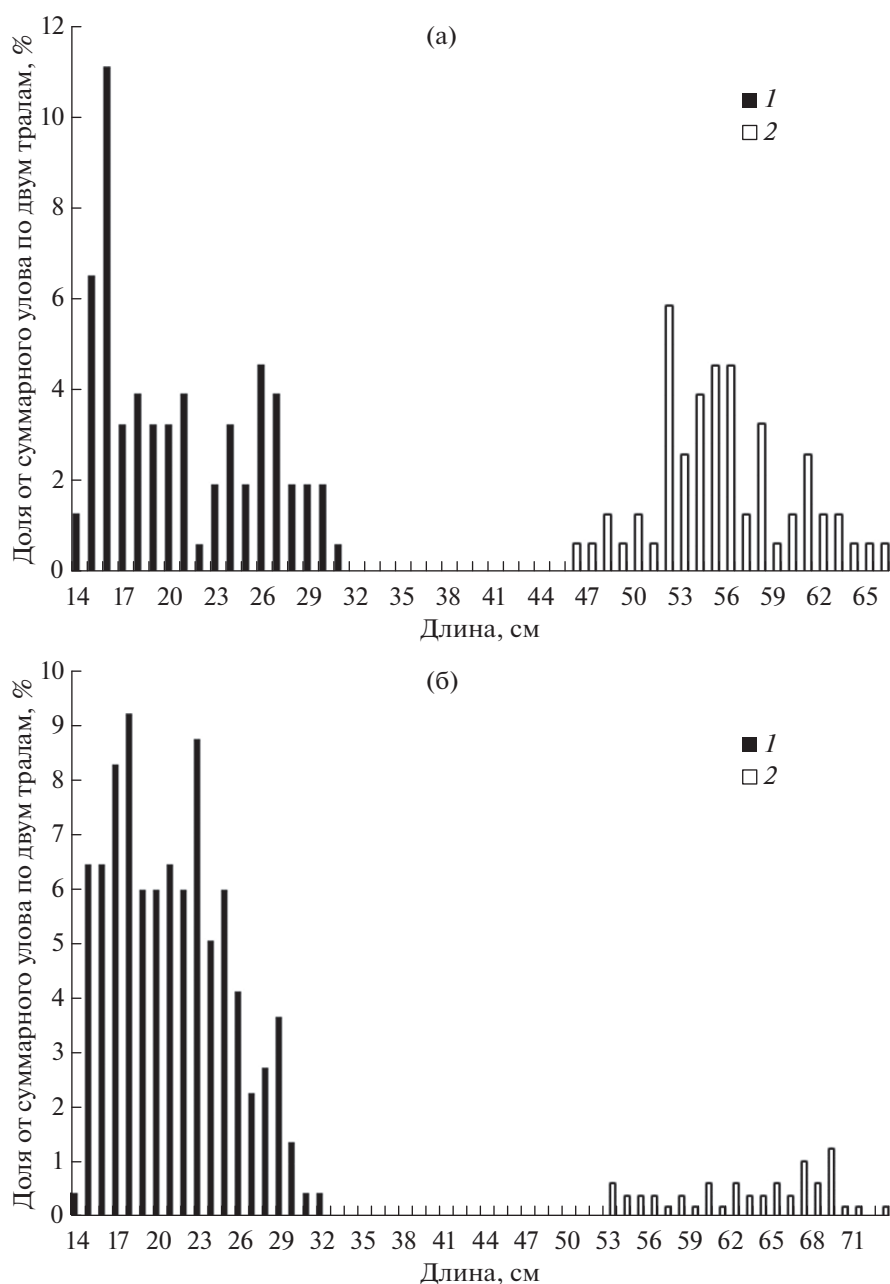
На наш взгляд, совпадение двух факторов (наличие большой концентрации капсул и присутствие мелкоразмерной молоди) служит подтверждением того, что в данном месте на глубине 350–351 м на траверзе о-ва Парамушир расположено нерестилище ската Таранца и фиолетового ската. Обнаружение пустых и поврежденных капсул, покрытых обрастателями, а также капсул, содержащих яйца или эмбрионы, свидетельствует о том, что обнаруженное нерестилище существует в течение длительного времени. На основании сходных данных выделяются нерестилища массовых видов скатов рода *Bathyraja*, при этом нерестовые участки могут использоваться как одним видом, так и двумя видами скатов и более (Hoff, 2009, 2010; Hunt et al., 2011).



**Рис. 1.** Пространственное распределение ската Таранца *Bathyraja taranetzi* (а) и фиолетового ската *B. violacea* (б) в тихоокеанских водах северных Курильских островов и у юго-восточной Камчатки в съемке 2018 г. Прямоугольником выделен разрез, на котором находилось нерестилище. На увеличенных частях рисунка символы показывают начало траления, а отрезок показывает направление и длительность траления.

Данные о максимальной длине эмбрионов в капсулах и о длине, при которой происходит вылупление молоди, для исследованных нами видов скатов отсутствуют. У близкого по размерам северо-тихоокеанского прерывчатого ската *B. interrupta* максимальная длина эмбрионов в капсулах составляет 16–17 см (Hoff, 2010). Для щитоносного

(*B. parmifera*) и алеутского (*B. aleutica*) скатов известно, что разница между максимальной длиной эмбрионов в капсулах и минимальной длиной вылупившейся молоди составляет 2–3 см (Hoff, 2009, 2010). На основании этих сведений можно предположить, что обнаруженные на нерестилище особи ската Таранца и фиолетового ската дли-



**Рис. 2.** Размерный состав ската Таранца *Bathyrja taranetzi* (а) и фиолетового ската *B. violacea* (б): 1 – на нерестилище, глубина 350–351 м; 2 – на глубине 251 м.

ной 14–20 см (рис. 2) недавно вылупились из капсул. Южнее места траления, в ходе которого было обнаружено нерестилище скатов, на сходной глубине (351 м) была выловлена особь ската Таранца с минимальным размером 11.3 см. Известно, что минимальный размер особей фиолетового ската, встречавшихся в уловах, составлял 12 см (Григоров и др., 2017). Вылупление особей с такими размерами, вероятно, происходит лишь у отдельных животных, как правило, вылупившиеся из капсул особи крупнее.

Следует отметить, что на нерестилище ската Таранца и фиолетового ската в тихоокеанских водах о-ва Парамушир одновременно были обнаружены капсулы, а также недавно вылупившиеся (14–20 см) и более крупные особи (до 32 см) обоих видов (рис. 2). Вероятно, молодь ската Таранца и фиолетового ската не сразу покидает нерестилище, а какое-то время держится вблизи него. Однако по данным Хоффа (Hoff, 2008, 2016) у щитоносного и алеутского скатов в восточной части Берингова моря места концентрации их молоди

(до 30 см) и известные нерестилища не совпадают, но часто совпадают районы концентрации производителей и нерестилища. Указанные различия обусловлены, вероятно, биотопическими особенностями дна и специфической гидрологией в исследованном районе тихоокеанских вод северных Курильских островов.

В ходе проведенных ранее донных тралений (1500 тралений, 19 донных траловых съежек в период с 1993 по 2000 г.) не удалось обнаружить нерестилища обоих видов скатов и места концентрации молоди ската Таранца (Orlov et al., 2006; Orlov, Tokranov, 2010; Григоров и др., 2017). Нерестилища ската Таранца не были обнаружены и при проведении интенсивных исследований на шельфе и материковом склоне в восточной части Берингова моря (Hoff, 2010). На особые условия обитания ската Таранца в тихоокеанских водах северных Курильских островов указывает и то, что ранняя молодь (до 20 см) этого вида в значительном количестве встречалась здесь на глубинах 300–400 м, тогда как в восточной части Берингова моря она приурочена к глубинам 550–800 м (Hoff, 2010).

Анализ размерного состава обоих видов скатов показал, что выше нерестилища на глубине 251 м (рис. 2) концентрировались производители и созревающие особи. В пределах ареала самцы ската Таранца достигают половой зрелости при длине 53.1–63.2 см, самки – 61.4–66.3 см; у фиолетового ската эти показатели составляют соответственно 53.9–73.2 и 61.2–76.4 см (Долганов, 1998; Ebert, 2005; Орлов, 2006). Следует отметить, что среди пяти вскрытых взрослых самок фиолетового ската у одной самки в районе нерестилища (TL 70.1 см) в яйцеводах были найдены капсулы со зрелыми яйцами. Вскрытия самок ската Таранца не проводили. В районе обнаруженного нами нерестилища нерестовые особи фиолетового ската в этом тралении встречались и ранее: в декабре в этом районе на глубине 305–309 м были обнаружены две самки фиолетового ската, у которых из клоаки торчали капсулы, готовые к вымету; левые яйцеводы обеих самок содержали еще по одному зрелому яйцу (Орлов, Бирюков, 2005).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы использования животных были соблюдены.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Григоров И.В., Байталюк А.А., Орлов А.М. Пространственное распределение, размерный состав и динамика уловов фиолетового ската *Bathyrāja violacea* в северной Пацифике // Вопр. ихтиологии. 2017. Т. 57. № 5. С. 553–567.  
<https://doi.org/10.7868/S0042875217050095>
- Долганов В.Н. Размножение скатов семейства Rajidae дальневосточных морей России // Изв. ТИНРО. 1998. Т. 124. С. 425–428.
- Орлов А.М. К обоснованию промысловой меры дальневосточных скатов (сем. Rajidae) на примере массовых западноберинговоморских видов // Методические аспекты исследований рыб морей Дальнего Востока: Тр. ВНИРО / Отв. ред. О.А. Булатов. М.: Изд-во ВНИРО. 2006. Т. 146. С. 252–264.
- Орлов А.М., Бирюков И.А. О поимке готовых к откладке яйцевых капсул самок фиолетового ската *Bathyrāja violacea* (Rajidae) // Вопр. ихтиологии. 2005. Т. 45. № 3. С. 426–429.
- Ebert D.A. Reproductive biology of skates, *Bathyrāja* (Ishiyama), along the eastern Bering Sea continental slope. // J. Fish Biol. 2005. V. 66. P. 618–649.  
<https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2005.00628.x>
- Hoff G.R. A nursery site of the Alaska skate (*Bathyrāja parmifera*) in the eastern Bering Sea // Fish. Bull. 2008. V. 106. № 3. P. 233–244.
- Hoff G.R. Embryo developmental events and the egg case of the Aleutian skate *Bathyrāja aleutica* (Gilbert) and the Alaska skate *Bathyrāja parmifera* (Bean) // J. Fish Biol. 2009. V. 74. P. 483–501.  
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.02138.x>
- Hoff G.R. Identification of skate nursery habitat in the eastern Bering Sea // Mar. Ecol.: Prog. Ser. 2010. V. 403. P. 243–254.  
<https://doi.org/10.3354/meps08424>
- Hoff G.R. Identification of multiple nursery habitats of skates in the eastern Bering Sea // J. Fish Biol. 2016. V. 88(5). P. 1746–1757.  
<https://doi.org/10.1111/jfb.12939>
- Hoff G.R. Where do baby skates come from? Alaska Fisheries Science Center. [https://www.afsc.noaa.gov/Education/pdfs/Eggcase\\_brochure.pdf](https://www.afsc.noaa.gov/Education/pdfs/Eggcase_brochure.pdf)
- Hunt J.C., Lindsay D.J., Shahalemi R.R. A nursery site of the golden skate (Rajiformes: Rajidae: *Bathyrāja smirnovi*) on the Shiribeshi Seamount, Sea of Japan // Mar. Biodiversity Rec. 2011. V. 4. Art. ID e70.  
<https://doi.org/10.1017/S1755267211000728>
- Luer C.A., Walsh C.J., Bodine A.B., Wyffels J.T. Normal embryonic development in the clearrnose skate, *Raja eglanteria*, with experimental observations on artificial insemination // Biology of Skates / Developments in Environmental Biology of Fishes 27. Ebert D.A., Sulikowski J.A. (eds). Dordrecht: Springer. 2007. V. 27. P. 239–255.  
<https://doi.org/10.1007/s10641-007-9219-4>
- Mecklenburg C.W., Mecklenburg T.A., Thorsteinson L.K. Fishes of Alaska. 2002. Bethesda, Maryland: Am. Fish. Soc. 1037 p.
- Orlov A.M., Tokranov A.M., Fatykhov R.N. Common deep-benthic skates (Rajidae) of the northwestern Pacific: Basic ecological and biological features // Cybium. 2006. V. 30. № 4 suppl. P. 49–65.

Orlov A.M., Tokranov A.M. Reanalysis of long-term surveys on the ecology and biology of mud skate (*Rhinoraja taranetzi* Dolganov, 1985) in the northwestern Pacific (1993–2002) // J. Appl. Ichthyol. 2010. V. 26. № 6. P. 861–871.

<https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01512.x>

Parin N.V., Evseenko S.A., Vasil'eva E.D. Fishes of Russian seas: annotated catalogue. Moscow: KMK. 2014. 733 p.

Savin A.B., Balanov A.A., Panchenko V.V. The current structure of the ichthyofauna on the continental shelf's outer edge and upper slope of the northern Kuril Islands and southeastern Kamchatka // J. Ichthyol. 2019. V. 59. № 4. P. 499–515.

<https://doi.org/10.1134/S0032945219040143>

Wourms J.P. Reproduction and development in chondrichthyan fishes. // Am. Zool. 1977. V. 17. P. 379–410.

## The First Record of Spawning Ground of the Mud Skate *Bathyraja taranetzi* (Dolganov, 1983) and the Okhotsk Skate *B. violacea* (Suvorov, 1935) in Pacific Waters off the Northern Kuril Islands

A. A. Balanov<sup>a</sup>, V. V. Panchenko<sup>a</sup>, and A. B. Savin<sup>b</sup>

<sup>a</sup>A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

<sup>b</sup>Pacific Branch, Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography (TINRO), Vladivostok 690091, Russia

A spawning ground of the mud skate *Bathyraja taranetzi* and the Okhotsk skate *B. violacea* was recorded for the first time from Pacific waters off the northern Kuril Islands. It was located at 50°25'7" N, 157°22'7" E, and a depth of 350–351 m; the water temperature was 3.8°C. At the spawning ground, egg cases and recently hatched juveniles were found in large numbers.

**Keywords:** *Bathyraja taranetzi*, *Bathyraja violacea*, spawning ground, egg case, size, Paramushir Island