

---

---

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 46, номер 4, 2020

---

---

## Обзор

- Гены гормона роста у рыб: структура и дивергенция  
*Д. Н. Каменская, В. А. Брыков* 219
- Бентосные диатомовые водоросли российских вод Японского моря  
и сопредельных акваторий  
*А. А. Бегун, Л. И. Рябушко* 231
- 

## Оригинальные статьи

- Микобиота дальневосточной наваги *Eleginus gracilis* (Tilesius, 1810) и азиатской корюшки *Osmerus mordax dentex* Steindachner & Kner, 1870 в заливе Петра Великого Японского моря  
*Л. В. Зверева, О. Г. Борзых* 242
- Морфология мандибул личинок и взрослых роющих креветок *Boasaxius princeps* и *Leonardsaxius amurensis* (Decapoda: Axiidea: Axiidae)  
*Е. С. Корниенко, Д. Д. Голубинская* 247
- Особенности восстановления гликогена в мышцах и печени у рыб разной плавательной способности после вылова донным тралом  
*Е. Н. Силкина, Ю. А. Силкин, М. Ю. Силкин* 261
- Влияние липидного комплекса экстракта из морской красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis* (Kanno et Matsubara) Makienko на биохимические показатели плазмы крови и мембран эритроцитов при экспериментальном стрессе  
*Н. Ф. Кушнерова, С. Е. Фоменко, В. Г. Спрыгин, Т. В. Момот* 269
- Многолетняя динамика и морфология диатомовой водоросли *Thalassiosira nordenskioldii* Cleve, 1873 (Bacillariophyta) в прибрежных водах залива Петра Великого Японского моря  
*О. Г. Шевченко, М. А. Шульгина, В. М. Шулькин, К. О. Тевс* 277
- 

## Краткие сообщения

- Гидролитические ферменты из морских организмов как ингибиторы образования биопленок  
*Н. А. Терентьева, Н. С. Буйновская, Ю. А. Носкова, Л. В. Слепченко, О. И. Недашковская, Л. А. Текутьева, Л. А. Балабанова* 285
- 
-

# Contents

---

---

Volume 46, No 4, 2020

---

---

## Review

- Fish Growth Hormone Genes: Structure and Divergence  
*D. N. Kamenskaya and V. A. Brykov* 219
- Benthic Diatoms of the Russian Waters of the Sea of Japan and Adjacent Sea Areas  
*A. A. Begun and L. I. Ryabushko* 231
- 

## Original papers

- Mycobiota of the Saffron Cod *Eleginus gracilis* (Tilesius, 1810) and the Asiatic Smelt *Osmerus mordax dentex* Steindachner & Kner, 1870 in Peter the Great Bay of the Sea of Japan  
*L. V. Zvereva and O. G. Borzykh* 242
- The Morphology of the Mandibles of Larval and Adult Lobster Shrimps *Boasaxius princeps* and *Leonardsaxius amurensis* (Decapoda: Axiidea: Axiidae)  
*E. S. Kornienko and D. D. Golubinskaya* 247
- The Pattern of Glycogen Recovery in Muscles and Liver of Fishes with Different Swimming Capabilities after being Caught in a Bottom Trawl  
*E. N. Silkina, Yu. A. Silkin, and M. Yu. Silkin* 261
- Effects of the Lipid Complex of Extract from the Marine Red Algae *Ahnfeltia tobuchiensis* (Kanno et Matsubara) Makienko on the Biochemical Parameters of Blood Plasma and Erythrocyte Membranes during Experimental Stress Exposure  
*N. F. Kushnerova, S. E. Fomenko, V. G. Sprygin, and T. V. Momot* 269
- Long-Term Dynamics and Morphology of the Diatom *Thalassiosira nordenskiöldii* Cleve, 1873 (Bacillariophyta) from the Coastal Waters of Peter the Great Bay, Sea of Japan  
*O. G. Shevchenko, M. A. Shulgina, V. M. Shulkin, and K. O. Tevs* 277
- 

## Brief notes

- Hydrolytic Enzymes from Marine Organisms as Inhibitors of Biofilm Formation  
*N. A. Terenteva, N. S. Buinovskaya, Yu. A. Noskova, L. V. Slepchenko, O. I. Nedashkovskaya, L. A. Tekuteva and L. A. Balabanova* 285
- 
-

## ГЕНЫ ГОРМОНА РОСТА У РЫБ: СТРУКТУРА И ДИВЕРГЕНЦИЯ<sup>1</sup>

© 2020 г. Д. Н. Каменская<sup>1</sup>, В. А. Брыков<sup>1, 2, \*</sup>

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

<sup>2</sup>Дальневосточный федеральный университет, Школа естественных наук,  
Владивосток 690012, Россия

\*e-mail: vlbrykov@mail.ru

Поступила в редакцию 04.12.2019 г.

После доработки 02.03.2020 г.

Принята к публикации 19.03.2020 г.

В обзоре приведены сведения о структуре генов гормона роста (ГПР) у рыб и о дивергенции кодирующих, интронных и прилежащих фланкирующих участков, в том числе оригинальные данные, полученные в нашей лаборатории. У большинства видов рыб ГПР представлен единственной копией, однако имеются таксономические группы с двумя паралогичными генами. Кодирующие последовательности ГПР консервативны, вариации длины генов обусловлены длиной некодирующих и фланкирующих участков и интронов. Скорость дивергенции последовательностей генов различается в разных таксономических группах и варьирует во времени внутри групп. Во фланкирующих участках консервативными являются только регуляторные элементы.

**Ключевые слова:** ген гормона роста, регуляторные элементы, дивергенция

**DOI:** 10.31857/S0134347520040038

### *Общие представления о структуре генов гормона роста позвоночных животных*

Гормон роста (соматотропный гормон, СТГ, соматотропин) — один из гормонов передней доли гипофиза. Он относится к классу полипептидных гормонов, регулирует рост и другие физиологические процессы в организме. Гормон роста вместе с пролактином и соматолактином входит в семейство гипофизарных гормонов.

В настоящее время наиболее хорошо изучены и охарактеризованы гены гормона роста человека (ГПР, hGH), некоторых млекопитающих и других позвоночных животных. В геноме человека ГПР, hGH и плацентарные лактогены (hPL), известные также как гены хорионического соматомаммотропина (hCS), образуют кластер из пяти близко расположенных друг к другу генов. В состав этого кластера входят два гена hGH и три гена hPL (Hirt et al., 1987; Barrera-Saldaña, 1998). Ген hGH-N кодирует гипофизарный гормон роста, экспрессируется только в специализированных клетках аденогипофиза — соматотрофах. Ген hGH-V кодирует альтернативный вариант гормона роста, который заменяет гипофизарный гормон роста на поздних сроках беременности; он экспресси-

руется вместе с плацентарными лактогенами hPL в плаценте (Hirt et al., 1987; Chen et al., 1989a; Pérez-Maya et al., 2016). У всех пяти генов, включая их ближайшие фланкирующие области, были определены полные нуклеотидные последовательности (DeNoto et al., 1981; Hirt et al., 1987); они оказались консервативными больше чем на 95%. Полная нуклеотидная последовательность локуса hGH охватывает 66 495 пар нуклеотидов (п.н.) и содержит последовательности всех пяти генов. Каждый из пяти генов, входящих в кластер, состоит из пяти экзонов и четырех интронов. Гены разделены межгенными последовательностями длиной от 6 до 13 тыс. пар нуклеотидов (т.п.н.). Гены кластера экспрессируются в разных тканях и в разные временные промежутки, поэтому экспрессия находится под контролем разных регуляторных элементов, промоторов и энхансеров (Jones et al., 1995; Barrera-Saldaña, 1998; Su et al., 2000).

Организация кластера генов значительно варьирует у представителей разных групп приматов. У макаки-резус (*Macaca mulatta*), гамадрила (*Papio hamadryas*) и гориллы (*Gorilla gorilla gorilla*) в кластере шесть генов (включая псевдогены) (González-Alvarez et al., 2006; Rodríguez-Sánchez et al., 2010), у человека и шимпанзе — пять, у орангутана (*Pongo abelii*) четыре гена, но только три из них являются функциональными. У шимпанзе и орангутана, как и у человека, ген GH-N экспрессируется в ги-

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

пофизе, а продукт гена GH-V можно обнаружить в плаценте. Эволюция этих генов в семействе рассмотрена в обзоре Даза и Лархаммера (Daza, Larhammar, 2018).

У большинства млекопитающих, включая и большинство полубезьян, ГПР не формируют кластер гомологичных генов и в геноме можно обнаружить только одну копию. Тем не менее в разных отрядах млекопитающих встречаются виды, у которых обнаружено по два ГПР (Valinsky et al., 1990; Yamano et al., 1991; Wallis, Wallis, 2001; Maniou et al., 2004).

Структура ГПР у млекопитающих консервативна (Barta et al., 1981; Gordon et al., 1983; Wallis, Wallis, 1995; Das et al., 1996; Lioupis et al., 1999): кодирующая часть состоит из пяти экзонов, разделенных четырьмя интронами. Длина интронов у разных видов варьирует от 200 до 300 п.н.

Ген гормона роста птиц длиннее такового млекопитающих. Если средняя длина ГПР млекопитающих примерно 2 т.п.н., то длина ГПР птиц варьирует от 3 до 5 т.п.н. (Tanaka et al., 1992; Buggiotti et al., 2006; Kansaku et al., 2008). Различия в длине генов обусловлены разной длиной интронов. Несмотря на это, их количество остается таким же, как и в гене гормона роста млекопитающих: четыре интрона разделяют пять экзонов. Для представителей отряда воробьинообразные (Passeriformes) характерно наличие в геноме двух ГПР — GH1A и GH1B, и оба гена функциональны (Yuri et al., 2008; Arai, Iigo, 2010). Описание нуклеотидных последовательностей ГПР у рептилий и амфибий в литературе не встречается. Для некоторых представителей этих классов известны только аминокислотные последовательности гормона роста, количество аминокислот в которых совпадает с таковым в ГПР человека. Гормон роста у морской черепахи (*Chelonia mydas*) и крокодила (*Crocodylus novaeguineae*) состоит из 190 аминокислотных остатков. Сходство гормона роста рептилий с таковым млекопитающих составило 75–82%, птиц — 89%, костистых рыб — 33–59% (Yasuda et al., 1989; Noso et al., 1995). У амфибий аминокислотная последовательность ГПР известна только для лягушки-быка (*Rana catesbeiana*). Гормон роста у этого вида состоит из 190 аминокислот и имеет 69% гомологии с гормоном роста морской черепахи, 66% с гормоном роста курицы, 61% с гормоном роста овцы и 48% с гормоном роста человека (Kobayashi et al., 1991)

#### Структура генов гормона роста у рыб

Долгое время считали, что у бесчерепных рыб отсутствуют гены, кодирующие гипофизарные гормоны (Holland et al., 2008). Однако Ли с соавторами (Li et al., 2014) показали, что у ланцетника (*Branchiostoma japonicum*) имеется гормон, подоб-

ный гормону роста позвоночных (GH-like hormone), который является функциональным. Гормон роста ланцетника способен связываться с рецептором гормона роста (GHR); стимулировать экспрессию инсулин-подобного фактора роста (IGF); влиять на скорость роста рыб в условиях эксперимента и исправлять эмбриональные дефекты, вызванные нехваткой гормона роста. Последовательность кДНК гормона роста ланцетника состоит из 1646 п.н., из которых 627 п.н. приходится на открытую рамку считывания, а 1019 п.н. — на 3'-нетранслируемую область. Белок состоит из 208 аминокислот и на 14.5% идентичен другим известным гормонам роста. Это дает основание считать, что данная последовательность является предшественником для остальных генов семейства: пролактина и соматолактина (Li et al., 2014).

Полная нуклеотидная последовательность ГПР была получена для одного из самых древних представителей позвоночных — морской миноги *Petromyzon marinus* (Kawauchi et al., 2002; Moriyama et al., 2006). ГПР морской миноги является самым большим из всех известных генов GH, состоящих, как у человека, млекопитающих и птиц, из пяти экзонов и четырех интронов. Длина гена GH составляет 13 604 п.н. Он включает кодирующую и регуляторную части. Информация, которую кодирует каждый экзон, подобна информации, которую кодируют гены гормона роста млекопитающих и птиц. Первый экзон кодирует 5'-нетранслируемую область (UTR) и первые три аминокислоты сигнального пептида; а второй экзон — остальную часть сигнального пептида и N-конец (34 аминокислоты) зрелого белка. Третий и четвертый экзоны кодируют 42 и 44 аминокислоты зрелого гормона роста соответственно, а пятый экзон кодирует 61 аминокислоту и 3'-нетранслируемую область.

Ген гормона роста хрящевых рыб не отличается от такового большинства позвоночных животных. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности известны для катрана (*Squalus acanthias*) и большой голубой акулы (*Prionace glauca*). Ген гормона роста катрана состоит из пяти экзонов и четырех интронов; количество аминокислот, которые кодирует каждый экзон, сходно с таковым у других видов костистых рыб. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей показал, что ГПР катрана и большой голубой акулы ближе к таковому у четвероногих, чем у костистых рыб. Степень гомологии с четвероногими животными составляет 47–68%, с костистыми рыбами — 37–52%. Данное различие между хрящевыми и костистыми рыбами указывает на быструю молекулярную эволюцию ГПР у костистых рыб по сравнению с таковой у других групп позвоночных, у которых эволюция этого гормона протекала гораздо медленнее (Yamaguchi et al., 1989; Moriyama et al., 2008). Считают, что такая

структура (пять экзонов, четыре интрона) полностью отражает структуру гена-предшественника, который дал начало современным генам. Однако встречаются виды и группы видов, у которых структура ГГР отличается.

Среди костистых рыб можно выделить отряды, у видов которых в гене имеется еще один интрон и, соответственно, еще один экзон. На основании наличия или отсутствия дополнительного интрона ГГР по своей структуре виды могут быть разделены на две группы (Moriyama et al., 2006). В первую группу входят виды, у которых гены имеют такую же структуру, как у млекопитающих и птиц, и состоят из пяти экзонов и четырех интронов. Гены с подобной структурой встречаются у представителей отрядов карпообразных (Cypriniformes) и сомообразных (Siluriformes) (см.: Chiou et al., 1990; Hong, Schartl, 1993; Rajesh, Majumdar, 2007; Panicz et al., 2012; Sekar et al., 2014). Во вторую группу объединены виды, в генах которых присутствует пятый дополнительный интрон и они состоят из шести экзонов и пяти интронов. Такой ГГР встречается у представителей отрядов лососеобразных (Salmoniformes), окунеобразных (Perciformes), иглобрюхообразных (Tetraodontiformes) и камбалообразных (Pleuronectiformes) (Ber, Daniel, 1992; Male et al., 1992; Devlin, 1993; Du et al., 1993; Tanaka et al., 1995; Ohkubo et al., 1996; Venkatesh, Brenner, 1997; Панькова и др., 2017). Среди видов, имеющих ген с дополнительным интроном, выделяются виды с небольшим пятым интроном длиной 70–100 п.н., а также виды, у которых размер пятого интрона варьирует от 200 до 600 п.н. Небольшой интрон обнаружен у нильской тилляпии (*Oreochromis niloticus*), азиатского паралихта (*Paralichthys olivaceus*) и желтохвоста (*Seriola quinqueradiata*) (Ber, Daniel, 1992; Tanaka et al., 1995; Ohkubo et al., 1996), а интрон больших размеров найден в генах гормона роста лососеобразных рыб (Du et al., 1993; Yang et al., 1997; Панькова и др., 2017). Пока остается неясным, произошел ли пятый интрон, встречающийся в гене гормона роста окунеобразных и лососеобразных, от одной и той же предковой последовательности или возник независимо в разных отрядах. Сравнение нуклеотидных последовательностей этого интрона у тилляпии и лососевых показало, что последовательности имеют очень низкую степень гомологии. Это указывает на то, что данные типы интронов, возможно, эволюционировали от разных предковых последовательностей в результате инсерций (вставок) последовательностей в ген, которые произошли независимо друг от друга (Yang et al., 1997).

Размер ГГР у рыб варьирует в достаточно широких пределах: от 1.6 т.п.н. у латеса (*Lates calcarifer*) до более чем 4 т.п.н. у желтохвоста (*S. quinqueradiata*), что в 2 раза больше размера ГГР у млекопитающих (Chen et al., 1989a; Almuly et al., 2000;

Ruynänen, Primmer, 2006). Сравнение ГГР радужной форели и человека показало, что первые четыре экзона гена радужной форели гомологичны экзонам ГГР человека. Последний (пятый) экзон в ГГР человека эквивалентен экзонам V и VI гена гормона роста радужной форели (Chen et al., 1989a, 1989b). Такое различие в размерах может быть обусловлено не только присутствием дополнительного интрона в ГГР у представителей некоторых отрядов рыб, но и наличием тандемных повторов разной длины, а также возможных инсерций или делеций. Например, у представителей отряда карпообразных и млекопитающих количество экзонов и интронов одинаковое (5 экзонов и 4 интрона). Однако размер интронов и 3'-нетранслируемых областей у карповых рыб больше, чем у млекопитающих. У рыб 3'-нетранслируемая область в среднем длиной около 500 п.н., а у млекопитающих и птиц около 100 п.н. Длина первого, третьего и четвертого интронов в гене лососевых рыб в 2–2.5 раза больше, чем в гене млекопитающих (Zhu et al., 1992; Hong, Schartl, 1993).

У бурой фугу (*Fugu rubripes*) длина первого интрона составляет 608 п.н., и он в несколько раз длиннее, чем первый интрон в генах гормона роста других рыб. Определяется это наличием сателлитной последовательности длиной 438 п.н., состоящей из элементов длиной 42 п.н. (TACCTGAGGCTGAATCCACTGTCTTCCCTACCTGTCTAACCT) и их фрагментов. Такой повтор не был найден в интронах ГГР других костистых рыб; вероятно, эта вставка в интрон бурой фугу произошла относительно недавно. Во втором и пятом интронах ГГР бурой фугу встречаются тетра- и три-нуклеотидные (CTGT)<sub>28</sub> и тринуклеотидные (GAT)<sub>79</sub> повторы соответственно. Укороченный вариант тринуклеотидного повтора обнаружен в пятом интроне нильской тилляпии (*O. niloticus*), азиатского паралихта (*P. olivaceus*) и латеса (*L. calcarifer*). Считают, что этот минисателлитный повтор присутствовал в пятом интроне у общего предка иглобрюхообразных (Tetraodontiformes), камбалообразных (Pleuronectiformes) и окунеобразных (Perciformes) (Venkatesh, Brenner, 1997). Повторы разной длины встречаются в интронах ГГР дорады (*Sparus aurata*); минисателлитные повторы, состоящие из 17 и 22 нуклеотидов, можно обнаружить в первом и третьем интронах соответственно. Разные микросателлитные повторы из ди-, три- и тетра-нуклеотидов встречаются во всех интронах с первого по пятый. Инвертированные повторы, входящие в состав второго интрона, увеличивают его размер до 1747 п.н., что делает этот интрон самым большим вторым интроном из известных ГГР костистых рыб и млекопитающих (Almuly et al., 2000).

Среди рыб можно встретить примеры, когда размер ГГР изменяется не только в результате инсерций и увеличения числа повторов, но и за счет

делеций. У разных видов рыб рода лабео (*Labeo*) ГГР различается. Это связано с небольшими делециями, которые затронули и интроны, и экзоны. Длина транскрипта у всех видов этого рода составляет 630 п.н. (210 аминокислот); исключением является роху (*Labeo rohita*), у которого из-за делеции девяти нуклеотидов в четвертом экзоне длина транскрипта сократилась до 621 п.н., что соответствует 207 аминокислотам. Из четырех интронов только третий интрон демонстрирует изменчивость между видами (от 1069 до 1255 п.н.), это также связывают с небольшими делециями (Rajesh, Majumdar, 2007).

Разное количество интронов, их варибельность и присутствие повторяющихся последовательностей в гене могут служить естественным маркером для понимания эволюционных взаимоотношений в разных группах костистых рыб. Пятый интрон, который присутствует у представителей некоторых отрядов костистых рыб, делит их филогенетическое дерево на две группы. К первой группе относится надотряд костнопузырные (*Ostariophysi*); он объединяет карпообразных и сомообразных, у которых в составе ГГР всего четыре интрона. Вторая группа включает надотряды протолучеперых (*Protacanthopterygii*) и колючеперых (*Acanthopterygii*), имеющих общее происхождение, в составе ГГР которых присутствует пятый интрон. Поскольку в линии, ведущей к четвероногим, которая дивергировала от рыб в начале эволюции, в ГГР имеется только четыре интрона, пятый интрон, возможно, либо был приобретен общим предком протолучеперых и колючеперых после отделения костнопузырных, либо присутствовал у общего предка и был утрачен в линии, ведущей к костнопузырным и четвероногим (Venkatesh, Brenner, 1997). Аргументом в пользу этой гипотезы стали результаты, полученные Раджешем и Маджумдарой (Rajesh, Majumdar, 2007), а также Секаром с соавторами (Sekar et al., 2014). На основании филогенетического анализа кДНК гормона роста разных видов рыб было показано, что виды с одинаковым количеством экзонов и интронов в гене кластеризуются вместе. Так, виды из отрядов лососеобразных, окунеобразных и камбалообразных объединялись в один кластер, а в другом кластере находились виды, принадлежавшие к отрядам карпообразных и сомообразных (Rajesh, Majumdar, 2007; Sekar et al., 2014).

Анализ сателлитных последовательностей, которые встречаются в интронах ГГР рыб, также может указывать на степень родства. Например, в четвертом интроне ГГР у щуковых (*Esocidae*) присутствует минисателлитный повтор длиной 33 нуклеотида, количество его копий варьирует от 7 до 16 у разных видов. Идентичная последовательность присутствует и в ГГР лососевых, но только в единичной копии. Это может указывать

на наличие такой последовательности у общего предка, а также на увеличение копий данной последовательности у щуковых после дивергенции щуковых и лососевых (Barnett et al., 2007).

У костистых рыб ГГР различаются не только размерами, но и количеством генов, представленных в геноме. Среди рыб встречаются виды, у которых ГГР, как и у большинства млекопитающих, представлен одной копией. Одна копия ГГР была найдена у бурой фугу (*F. rubripes*) (Venkatesh, Brenner, 1997), дорады (*S. aurata*) (см.: Almuly et al., 2000), у исследованных видов рода лабео (*Labeo*) (см.: Rajesh, Majumdar, 2007) и у некоторых представителей карпообразных: белого амура (*Ctenopharyngodon idellus*) (Zhu et al., 1992) и белого толстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*) (Hong, Schartl, 1993).

В геномах других исследованных видов рыб ГГР представлен двумя несвязанными паралогичными генами *gh1* и *gh2*. Два гена обнаружено у нильской тилапии (*O. niloticus*). Две копии гена тилапии имеют одинаковую структуру (5 интронов, 6 экзонов) и являются функциональными, поскольку было показано, что они кодируют одинаковую белковую последовательность (Ber, Daniel, 1992). Среди карпообразных встречаются виды с двумя копиями ГГР. По две копии гена имеют все виды семейства чукучановых (*Catostomidae*) и некоторые представители семейства карповых. У большинства лососеобразных ГГР также представлен двумя копиями. Увеличение числа генов связано с полной дубликацией генома, в результате которой некоторые виды стали тетраплоидными и в их геноме присутствует по две копии ГГР, а виды, сохранившие диплоидный геном, имеют одну копию (Chiou et al., 1990; Zhu et al., 1992; Bart Jr. et al., 2010; Каменская и др., 2015, 2017; Панькова и др., 2017).

У лососевых, которые представляют собой уникальный случай автотетраплоидизации 25–100 млн лет назад, оба гена существуют на протяжении всего времени дивергенции видов в этой группе (Allendorf, Thorgaard, 1984). По две копии ГГР (*gh1* и *gh2*) были идентифицированы в геноме основных представителей семейства лососевых (*Salmonidae*): атлантического лосося (*Salmo salar*), нерки (*Oncorhynchus nerka*), кеты (*O. keta*), кижуча (*O. kisutch*), радужной форели (*O. mykiss*), чавычи (*O. tshawytscha*), а также у четырех видов гольцов рода *Salvelinus*: северной мальмы (*S. malma*), южной мальмы (*S. curilus*), гольца Леванидова (*S. levanidovi*) и гольца Таранца (*S. taranetzi*) (Kawauchi et al., 1986; Agellon et al., 1988; Johansen et al., 1989; Male et al., 1992; Devlin, 1993; Du et al., 1993; Forbes et al., 1994; Панькова и др., 2017). У всех исследованных видов рыб оба гена состоят из шести экзонов и пяти интронов. Размер экзонов двух генов у всех видов лососевых идентичен и составляет 74,

140, 117, 156, 147 и 63 п.н. для I–VI экзонов соответственно (Agellon, Chen, 1986; Male et al., 1992; Devlin, 1993; Du et al., 1993; Панькова и др., 2017). Интроны в ГГР лососевых различаются по размеру. Различия связаны с присутствием инсерций и делеций внутри последовательностей интронов. Из-за разной длины интронов размер ГГР варьирует как у разных видов лососевых, так и у двух копий гена одного вида. Интрон С в генах *gh1* тихоокеанского и атлантического лососей больше, чем в генах *gh2* у этих видов (Male et al., 1992; Yang et al., 1997). У представителей рода *Oncorhynchus* пятый интрон Е в гене *gh1* в несколько раз больше (~600 п.н.), чем в гене *gh2* (~200–250 п.н.) (Devlin, 1993).

Делеции разной длины были обнаружены в третьем и четвертом интронах в ГГР некоторых видов лососевых. В гене *gh1* в интроне С у гольцов *S. curilus* и *S. fontinalis* обнаружена делеция из шести нуклеотидов (GTCTAC), а у остальных гольцов рода *Salvelinus* присутствовали две тандемные копии этого участка. Еще одна делеция размером 9 нуклеотидов (ATCACAATC) присутствовала в интроне С у *Salvelinus namaycush*. Укороченный вариант такой делеции (ACAATC) обнаружен у *O. nerka* и *O. tshawytscha*. В интроне D гена *gh1* у *Salvelinus leucomaenis* дважды повторялась последовательность из 11 нуклеотидов (CAGTGACATGA), которая у остальных лососевых была представлена единичной копией. В третьем интроне (С) гена *gh2* у атлантического лосося (*S. salar*), нерки (*O. nerka*), чавычи (*O. tshawytscha*) и гольца *S. leucomaenis* обнаружена делеция размером 167 п.н. Подобные вставки и делеции присутствовали во всех интронах, кроме второго; его длина в обеих копиях гена была одинаковой (Панькова и др., 2013).

#### Структура регуляторных участков гена гормона роста у рыб

Несмотря на то, что нуклеотидные последовательности ГГР получены для большого числа видов рыб, исследования механизмов, участвующих в инициации и регуляции транскрипции, ограничены видами лососевых и окунеобразных. В промоторе ГГР рыб представлены сайты связывания с такими же транскрипционными факторами, гормонами и другими регуляторными элементами, как и у большинства позвоночных животных. Однако встречаются сайты связывания с транскрипционными факторами, которые у других позвоночных не были описаны. Это можно объяснить тем, что гормон роста у рыб помимо основной функции стимуляции роста выполняет функции, связанные с метаболизмом углеводов и липидов, с регуляцией водно-солевого баланса и процессов размножения, а также принимает участие в адаптации к различным водным средам

при миграции из морского водоема в пресный и наоборот (Almuly et al., 2005).

ТАТА-боксы присутствуют во всех известных промоторных областях ГГР рыб. Занимает консервативное положение в промоторе, располагается на расстоянии –23/–25 п.н. от точки начала транскрипции; нуклеотидная последовательность (ТАТААА) идентична у представителей разных отрядов рыб (Sekkali et al., 1999; Almuly et al., 2005; Каменская и др., 2015, 2017). В промоторах паралогичных ГГР радужной форели (*O. mykiss*) *rtGH1* и *rtGH2* было обнаружено еще два ТАТА-боксы, расположенных выше “по течению” от точки начала транскрипции. Один из этих ТАТА-боксов (ТАТААТА) находится в положении –399/–393 п.н. в гене *rtGH1* и –402/–398 п.н. в гене *rtGH2* соответственно. Второй ТАТА-бокс (ТАТААСА) в гене *rtGH1* находится на расстоянии –657/–651 п.н. от точки начала транскрипции, а в гене *rtGH2* располагается на расстоянии –615/–611 п.н. Функция этих двух консенсусных последовательностей ТАТА пока неясна (Yang et al., 1997).

Как и у большинства позвоночных животных, в промоторе ГГР рыб присутствуют сайты связывания с транскрипционным фактором Pit-1, ответственным за тканеспецифичную экспрессию ГГР. По два сайта связывания с Pit-1 было обнаружено в промоторе у желтохвоста (*S. quinquerediata*) и азиатского паралихта (*P. olivaceus*), в остальных известных промоторах ГГР рыб количество сайтов связывания с Pit-1 непостоянное. В промоторе желтохвоста первая последовательность (ТТСААСАТ) располагается в положении –119/–112, вторая последовательность (АССТССАТ) – на бессмысловой цепи в положении –112/–105 (Ohkubo et al., 1996). Последовательности двух сайтов связывания с Pit-1 у азиатского паралихта находятся в положении от –70 до –53 п.н. и от –133 до –144 п.н. соответственно (Tanaka et al., 1995).

У мозамбикской тилапии (*Oreochromis mossambicus*) обнаружено несколько предполагаемых последовательностей, связывающихся с Pit-1, которые отличались не больше чем на 1 или 2 нуклеотида от консенсусной последовательности, и фланкированной с 5'-конца областью, богатой нуклеотидами А/Т. Рядом с ТАТА-боксом была обнаружена высоко консервативная последовательность (5'-GATGAATTTAAACAT-3') в положении –56/–42, которая встречается в большинстве промоторов других рыб и содержит потенциальный сайт для связывания с Pit-1, ориентированный в обоих направлениях (Sekkali et al., 1999). У золотистого спара (*S. aurata*) и латеса (*L. calcarifer*) помимо основных двух сайтов связывания с Pit-1, которые являются частью палиндромного повтора из 20 нуклеотидов, в дистальной части промотора встречается и несколько дополнитель-

ных сайтов связывания. У всех исследованных представителей отряда окунеобразных расстояние между ТАТА-боксом и сайтом связывания с транскрипционным фактором Pit-1 составляет 12 нуклеотидов. При сравнении с промоторами представителей из других отрядов такой закономерности не выявлено (Yowe, Epping, 1995; Almuly et al., 2005).

Наибольшее число сайтов связывания с транскрипционным фактором Pit-1 было обнаружено в 5'-фланкирующей области гена гормона роста лососевых рыб. При исследовании транскрипционного фактора Pit-1 радужной форели (*O. mykiss*) Ямада с соавторами (Yamada et al., 1993) показали, что в промоторе гена гормона роста форели с Pit-1 связываются не два участка, как у млекопитающих, а четыре. Все четыре участка лежат в области –300 п.н. (G1 –238/–220; G2 –182/–149; G3 –145/–113; G4 –66/–15) от точки инициации транскрипции, где сконцентрированы основные сайты связывания с факторами транскрипции, которые играют ключевую роль в образовании транскрипционного комплекса. Несколько сайтов связывания с Pit-1 было обнаружено у атлантического лосося (*S. salar*), чавычи (*O. tshawytscha*) (Von Schalburg et al., 2008) и у гольцов рода *Salvelinus* (Каменская и др., 2017). Необходимо отметить, что консенсусная последовательность сайта Pit-1 у рыб отличается от консенсусной последовательности, которая встречается у млекопитающих: (T/A)(T/A)TATNCAT. Отличия в консенсусной последовательности для сайта Pit-1 встречаются и у птиц. На основании анализа (Tanaka et al., 1992; Yamada et al., 1993) было предложено ввести новую консенсусную последовательность ((T/A)NCTNCAT) для сайтов связывания Pit-1 у костистых рыб и птиц (Ohkubo et al., 1996).

У костистых рыб, как и у млекопитающих, циклический АМФ (цАМФ) принимает непосредственное участие в регуляции транскрипции. В промоторе ГГР рыб элемент ответа на цАМФ (CRE) представлен асимметричной последовательностью TGACG. В промоторе ГГР латеса (*L. calcarifer*) и в промоторе радужной форели (*O. mykiss*) этот элемент расположен между двумя функциональными сайтами связывания с транскрипционным фактором Pit-1, но относительно точки начала транскрипции элемент ответа на цАМФ у латеса и форели занимает разное положение. Положение проксимального сайта связывания с цАМФ полностью совпадает у рыб, относящихся к отряду окунеобразных: золотистый спар (*S. aurata*), латес (*L. calcarifer*) и желтохвост (*S. quinquerediata*). В промоторе золотистого спара и желтохвоста были обнаружены два дополнительных CRE элемента, которые не сопряжены с сайтами Pit-1. Вероятно, у окунеобразных взаимодействие с цАМФ происходит не напрямую, как было показано для лососевых, а с использова-

нием других механизмов. Так, в промоторе тилапии не обнаружено ни одной последовательности CRE, а белки, связывающиеся с CREB, принимают участие в транскрипции, взаимодействуя непосредственно с сайтами Pit-1 (Argenton et al., 1996; Almuly et al., 2005).

Вместе с тканеспецифичным фактором Pit-1 непосредственное участие в регуляции транскрипции ГГР у рыб принимают глюкокортикоиды, рецепторы ретиноевой кислоты и тиреоидного гормона. Регуляция транскрипции осуществляется за счет связывания комплекса рецепторов гормонов с элементами ответа на гормоны (HRE), которые встречаются не только в промоторе, но и в других участках гена (Beato et al., 1989).

В промоторе ГГР радужной форели (*O. mykiss*) была идентифицирована последовательность элемента ответа на глюкокортикоиды (GRE) (TATACTnnnTGTTC), которая отличается дистальным гексануклеотидом от базовой известной канонической последовательности GRE (GC-TACAnnnTGTTC). Частичная гомология этого мотива с типичной последовательностью GRE имеет сходство с такими же нестандартными последовательностями GRE, которые взаимодействуют с глюкокортикоидами в промоторе ГГР крысы и некоторых других млекопитающих. Проксимальная часть последовательности GRE (TGTTC) в промоторе форели частично перекрывается с сайтом F2 транскрипционного фактора Pit-1, а дистальная часть GRE всего тремя нуклеотидами отделена от элемента ответа на цАМФ. Таким образом, данная область может представлять собой составной энхансер, который обеспечивает полноценную Pit-1-зависимую базальную транскрипцию ГГР радужной форели (rtGH) и регулирует его экспрессию в зависимости от физиологических потребностей (Bernardini et al., 1999; Argenton et al., 2002).

Элементы ответа на ретиноевую кислоту (RARE и RXRE) обычно состоят из двух прямых повторов (AGGTCA), разделенных пятью или двумя нуклеотидами, с которыми связывается рецептор ретиноевой кислоты. Рецептор ретиноевой кислоты может быть представлен в форме гомодимера (RXR/RXR) или гетеродимера (RAR/RXR) (Blomhoff, Blomhoff, 2006). Сайт связывания с гетеродимерной формой рецептора ретиноевой кислоты (RAR/RXR) встречается в промоторе генов *gh1* и *gh2* атлантического лосося (*S. salar*), чавычи (*O. tshawytscha*) (см.: Von Schalburg et al., 2008) и радужной форели (*O. mykiss*) (см.: Yang et al., 1997) в положении –106/–125 п.н. от точки инициации транскрипции. Практически эти же регуляторные элементы обнаружены нами в паралогичных ГГР у гольцов рода *Salvelinus*.

Последовательность TRE, с которой взаимодействует рецептор тиреоидного гормона, не была

описана для промоторов ГГР рыб. Однако в экспериментах по оценке гормонозависимой транскрипции в первичной культуре клеток гипофиза карпа при одновременной трансфекции рецепторов тиреоидного гормона, ретиноевой кислоты и гена люциферазы, находящегося под контролем промотора ГГР атлантического лосося, удалось зафиксировать достаточно высокий уровень экспрессии репортерного гена (Kliwer et al., 1992; Farchi-Pisanty et al., 1997; Sternberg, Moav, 1999).

Сайты связывания с транскрипционными факторами встречаются у рыб не только в промоторной области, но и в интронах гена гормона роста. В третьем интроне (интрон С) у радужной форели (*O. mykiss*) в составе двух АТ-богатых областей были обнаружены консенсусные последовательности (А/ТЗNCАТ), характерные для сайтов связывания с Pit-1. У разных видов рода лабео (*Labeo*) количество сайтов связывания с Pit-1, найденное в третьем интроне, варьировало (Bernardini et al., 1999; Rajesh, Majumdar, 2007). В четвертом интроне у атлантического лосося (*S. salar*) и чавычи (*O. tshawytscha*) был обнаружен элемент ответа на цАМФ, который отличался от элемента CRE в промоторе гена гормона роста и был представлен палиндромной последовательностью (ACTGCAGT) (Von Schalburg et al., 2008). Элемент ответа на эстрогены (ERE) был идентифицирован только в одном гене гормона роста (rtGH1) у радужной форели (*O. mykiss*) в интроне С (Yang et al., 1997). Однако у атлантического лосося (*S. salar*) и чавычи (*O. tshawytscha*) элемент ответа на эстрогены был обнаружен в промоторной области гена *gh2* (Von Schalburg et al., 2008). В работе Янг с соавторами (Yang et al., 1997) приведены последовательности, ответственные за связывание с рецепторами тиреоидного гормона, ретиноевой кислоты, прогестерона, андрогена и минералокортикоидов, которые встречаются в интронах гена гормона роста. В то же время положение этих сайтов в интронах, а также функция, которую они выполняют, пути их взаимодействия между собой и влияние друг на друга пока неизвестны (Yang et al., 1997).

#### Дивергенция генов гормона роста

Ядерные гены используются для филогенетических реконструкций и систематических построений относительно редко. Это обусловлено высокой консервативностью и, соответственно, слабым филогенетическим сигналом и низкой разрешимостью у близких видов. Еще одной проблемой для использования ГГР при филогенетических реконструкциях и систематических построениях является тот факт, что в эволюции гена во многих таксономических группах прослеживается нестандартная закономерность: медленная базальная скорость изменений прерывается периодами быстрой эволюции, которая иногда в

25–50 раз выше. Это известно для млекопитающих (Wallis, 1994; Wallis, Wallis, 1995; Wallis, 1996; Lioupis et al., 1997; Saunders et al., 1998; Wallis, Wallis, 2001; Wallis et al., 2001). ГГР у птиц характеризуется более постоянной и относительно низкой скоростью молекулярной эволюции, которая увеличивается в некоторых таксонах почти в 1.4 раза (Buggiotti, Primmer, 2006; Yuri et al., 2008).

Медленная эволюция гормона роста характерна и для большинства низших позвоночных животных:  $0.19–0.39 \times 10^{-9}$  аминокислотных замен в год. Это сопоставимо с базальной скоростью эволюции млекопитающих ( $0.21–0.28 \times 10^{-9}$ ). Однако и среди представителей низших позвоночных могли происходить вспышки быстрой эволюции. Увеличение скорости отмечается во время эволюции амфибий ( $0.86 \pm 0.13 \times 10^{-9}$  аминокислотных замен на сайт в год) и хрящевых рыб ( $0.54 \pm 0.10 \times 10^{-9}$  аминокислотных замен на сайт в год) (Wallis, 1996).

При сравнении последовательностей кДНК ГГР показано хорошее деление у рыб на уровне отрядов, но не внутри их (Sekar et al., 2014). Похожая картина наблюдается при сравнении аминокислотных последовательностей ГГР рыб (Deng et al., 2014). Рийнанен и Приммер (Ruunänen, Primmer, 2006) отмечают, что на уровне аминокислотных последовательностей дивергенция в разных отрядах костистых рыб варьирует четырехкратно – от 3% у сомовых до 12% у окуневых, и при сравнении всех видов в четырех отрядах достигает 29%. Средняя скорость замен аминокислот у рыб высокая ( $1.15 \pm 0.01 \times 10^{-9}$  аминокислотных замен на сайт в год) по сравнению с базальной в других таксонах позвоночных. Повышенная скорость дивергенции, как правило, свидетельствует о наличии положительного (направленного) отбора, но в большинстве работ не обнаружено его влияние, в то же время выявлен эффект отрицательного (очищающего) отбора (Ruunänen, Primmer, 2006). Периодические изменения в скорости дивергенции авторы связывают со случайными факторами, которые приводят к накоплению в том числе и аминокислотных замен с ослаблением отрицательного отбора по нефункциональным участкам продуктов гена.

В нашей работе мы сравнивали нуклеотидные и аминокислотные последовательности в двух паралогичных генах *gh1* и *gh2* у видов лососевых рыб из трех родов: *Salvelinus*, *Oncorhynchus* и *Salmo* (Панькова и др., 2017). Если рассчитывать скорость дивергенции каждого из генов для всех видов, исходя из максимального времени начальной дивергенции видов, то различия в скорости невелики:  $0.456 \times 10^{-9}$  для *gh1* и  $0.403 \times 10^{-9}$  для *gh2* на сайт в год. Однако, если рассчитывать ее отдельно для каждого таксона, то выявляются неожиданные различия. У гольцов в гене *gh1* не об-

наружено аминокислотных замен; в гене *gh2*, хотя и найдены аминокислотные замены, но их скорость низкая:  $0.043 \times 10^{-9}$ . В гене *gh2* у лососей рода *Oncorhynchus* скорость накопления аминокислотных замен ( $0.272 \times 10^{-9}$ ) больше чем в 2 раза по сравнению с таковой в гене *gh1* ( $0.12 \times 10^{-9}$ ). У представителей рода *Salmo* обнаружена обратная картина: скорость накопления аминокислотных замен в гене *gh1* превышает таковую в гене *gh2* более чем в 6 раз. Очевидно, это обусловлено факторами отбора, при этом отбор оказывается разнонаправленным. В одном таксоне очищающий отбор более интенсивный по одному гену-паралогу, в других таксонах – по другому.

Полученные данные в определенной степени согласуются с результатами, полученными на других группах рыб и позвоночных животных. Частичная, а у ряда видов полная последовательность сравнивалась в паралогичных ГПР, *gh1* и *gh2* у чукучановых рыб (отряд Сургиниформес; семейство Catostomidae) (Bart Jr. et al., 2010). Как и в нашем случае, паралоги были сходны по аминокислотным и нуклеотидным последовательностям больше чем на 90%; было также показано, что оба гена находятся под действием очищающего отбора. Величина дивергенции между *gh1* и *gh2* больше, чем в нашем случае, и в среднем составляет 9.61%. Средняя попарная дистанция внутри паралогов по нуклеотидным последовательностям оказалась также больше и составила 4.46 и 2.43% для *gh1* и *gh2* соответственно (Bart Jr. et al., 2010). Большая величина различий связана, очевидно, с большим временем существования карповых рыб и, соответственно, паралогичных ГПР.

#### Дивергенция некодирующих участков

Некодирующие участки генов также нечасто используются для систематических и филогенетических исследований, хотя они накапливают мутации с большей скоростью. Различия, которые встречаются в некодирующих последовательностях, позволяют использовать интроны в качестве маркеров для оценки филогенетических межродовых и межвидовых отношений внутри семейства. Филогенетический анализ интронов гена гормона роста использовался для изучения внутривидовых отношений тихоокеанских лососей и гольцов (Devlin, 1993; McKay et al., 1996; Westrich et al., 2002; Панькова и др., 2013). На основании филогенетического анализа интронов С и D генов *gh1* и *gh2* были показаны сестринские отношения между родами *Oncorhynchus* и *Salvelinus*, но не между *Salmo* и *Oncorhynchus*, как ожидалось по аналогии с морфологическими данными (Oakley, Phillips, 1999; Phillips et al., 2004). Тем не менее, использование некодирующих последовательностей затруднено, что обусловлено наличием большого числа инделей.

Фланкирующие области двух ГПР, как и интроны, менее консервативны и демонстрируют низкий уровень гомологии. Гены *gh1* и *gh2* радужной форели имеют 78.6 и 89.2% гомологии в 3' и 5'-нетранслируемых областях соответственно по сравнению с 96.8% гомологии в кодирующих областях (Chen et al., 1989b). Анализ генов гормона роста нерки показал, что некодирующие области двух генов существенно различаются; это может быть связано с отсутствием генной конверсии между двумя генами (Devlin, 1993). Как отмечено выше, во многих случаях паралогичные гены могут кодировать почти идентичные белки. Такая картина характерна и для лососевых рыб (Каменская и др., 2017). Одна из траекторий эволюции дублированных копий генов заключается в субфункционализации генов. Субфункционализация не обязательно предполагает приобретение новой функции, но возможна дифференциальная экспрессия копий генов в разных тканях. Поэтому представляет интерес сравнительный анализ изменчивости в регуляторных цис-расположенных элементах в генах-паралогах ГПР.

В нашей работе распределение изменчивых сайтов оценивалось в 5'-фланкирующих участках длиной 300 п.н. как у гольцов рода *Salvelinus*, так и при сравнении с промоторами ГПР других видов лососевых рыб. Промоторные участки в обоих генах представителей рода *Salvelinus* очень консервативны по всей длине. В гене *gh1* выявляются два участка изменчивости: первый непосредственно прилегает к ТАТА-боксу, второй локализован между сайтами F1 и F2. Два участка изменчивости обнаруживаются и в гене *gh2*, но они различаются по своей локализации: первый участок находится в непосредственной близости к сайту F3, а второй располагается между сайтами F3 и F4. Сравнительный анализ промоторных участков ГПР показал консервативность некоторых регуляторных элементов (ТАТА-боксы, F1 сайта и CRE), но не всех последовательностей.

Промоторная последовательность гена *gh2* у всех видов лососевых рыб демонстрирует большую изменчивость, чем гена *gh1*. Консервативными участками остаются ТАТА-бокс, F1 участок, RARE/RXRE и CRE элементы. Максимально изменчивые последовательности выявлены в участках между сайтами связывания с транскрипционным фактором Pit-1 F1 и F2, а также между сайтами F3 и F4.

Ген гормона роста рыб – один из первых генов, успешно использованных для создания новых линий рыб с высокими хозяйственно-полезными признаками, в частности, с высокой скоростью роста. Поэтому представляется необходимым анализ ГПР в разных группах, в том числе и с целью геномного редактирования (Houston, Macqueen, 2019).

## 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.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Каменская Д.Н., Панькова М.В., Атопкин Д.М., Брыков Вл.А. Гены гормона роста у рыб: доказательства функциональности паралогичных генов гольца *Salvelinus levanidovi* // Молекуляр. биология. 2015. Т. 49. № 5. С. 770–776.
- Каменская Д.Н., Панькова М.В., Атопкин Д.М., Брыков Вл.А. Дивергенция паралогичных генов гормона роста и цис-регуляторных участков у лососевых рыб // Молекуляр. биология. 2017. Т. 51. № 2. С. 314–323.
- Панькова М.В., Брыков Вл.А., Панькова В.В., Атопкин Д.М. Гены гормона роста рыб. Дивергенция последовательностей интронов у гольцов рода *Salvelinus* // Генетика. 2013. Т. 49. № 6. С. 1–8.
- Панькова М.В., Кухлевский А.Д., Брыков Вл.А. Гены гормона роста: дивергенция кодирующих последовательностей у лососевых рыб // Генетика. 2017. Т. 53. № 2. С. 201–213.
- Agellon L.B., Chen T.T. Rainbow trout growth hormone: molecular cloning of cDNA and expression in *Escherichia coli* // DNA. 1986. V. 5. № 6. P. 463–471.
- Agellon L.B., Davies S.L., Chen T.T., Powers D.A. Structure of a fish (rainbow trout) growth hormone gene and its evolutionary implications // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1988. V. 85. № 14. P. 5136–5140.
- Allendorf F.W., Thorgaard G.H. Tetraploidy and the evolution of salmonid fishes // Evolutionary Biology of Fishes. – N.Y.: Plenum Press. 1984. P. 1–53.
- Almuly R., Cavari B., Ferstman H. et al. Genomic structure and sequence of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth hormone-encoding gene: Identification of minisatellite polymorphism in intron I // Genome. 2000. V. 43. № 5. P. 836–845.
- Almuly R., Poleg-Danin Y., Gorshkov S. et al. Characterization of the 5' flanking region of the growth hormone gene of the marine teleost, gilthead sea bream *Sparus aurata*: analysis of a polymorphic microsatellite in the proximal promoter // Fish. Sci. 2005. V. 71. № 3. P. 479–490.
- Arai N., Iigo M. Duplicated growth hormone genes in a passerine bird, the jungle crow (*Corvus macrorhynchos*) // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010. V. 397. № 3. P. 553–558.
- Argenton F., Bernardini S., Puttini S. et al. A TGACG motif mediates growth-hormone-factor-1/pituitary-transcriptional-activator-1-dependent cAMP regulation of the rainbow trout growth-hormone promoter // Eur. J. Biochem. 1996. V. 238. № 3. P. 591–598.
- Argenton F., Vianello S., Bernardini S. et al. Trout GH promoter analysis reveals a modular pattern of regulation consistent with the diversification of GH gene control and function in vertebrates // Mol. Cell. Endocrinol. 2002. V. 189. № 1–2. P. 11–23.
- Barnett K.R., Hopkins R.L., Peyton D.K. A minisatellite in the growth hormone gene of Esocidae is derived from a single copy element in the salmonid genome // Copeia. 2007. V. 2007. № 1. P. 205–211.
- Barrera-Saldaña H.A. Growth hormone and placental lactogen: biology, medicine and biotechnology // Gene. 1998. V. 211. № 1. P. 11–18.
- Bart H.L., Jr., Reneau P.C., Doosey M.H., Bell C.B. Evolutionary divergence of duplicate copies of the growth hormone gene in suckers (Actinopterygii: Catostomidae) // Int. J. Mol. Sci. 2010. V. 11. № 3. P. 1090–1102.
- Barta A., Richards R.I., Baxter J.D., Shine J. Primary structure and evolution of rat growth hormone gene // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 8. P. 4867–4871.
- Beato M., Chalepakis G., Schauer M., Slater E.P. DNA regulatory elements for steroid hormones // J. Steroid Biochem. 1989. V. 32. № 5. P. 737–748.
- Ber R., Daniel V. Structure and sequence of the growth hormone-encoding gene from *Tilapia nilotica* // Gene. 1992. V. 113. № 2. P. 245–250.
- Bernardini S., Argenton F., Vianello S. et al. Regulatory regions in the promoter and third intron of the growth hormone gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum // Gen. Comp. Endocrinol. 1999. V. 116. № 2. P. 261–271.
- Blomhoff R., Blomhoff H.K. Overview of retinoid metabolism and function // J. Neurobiol. 2006. V. 66. № 7. P. 606–630.
- Buggiotti L., Hellström M.A., Primmer C.R. Characterization of the first growth hormone gene sequence for a passerine bird—the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) // DNA Sequence. 2006. V. 17. № 6. P. 401–406.
- Buggiotti L., Primmer C.R. Molecular evolution of the avian growth hormone gene and comparison with its mammalian counterpart // J. Evol. Biol. 2006. V. 19. № 3. P. 844–854.
- Chen E.Y., Liao Y.-C., Smith D.H. et al. The human growth hormone locus: Nucleotide sequence, biology, and evolution // Genomics. 1989a. V. 4. № 4. P. 479–497.
- Chen T.T., Agellon L.B., Lin C.M. et al. Evolutionary implications of two rainbow trout growth hormone genes // Fish Physiol. Biochem. 1989b. V. 7. art. ID 381. <https://doi.org/10.1007/BF00004732>
- Chiou C.-S., Chen H.T., Chang W.C. The complete nucleotide sequence of the growth-hormone gene from the common carp (*Cyprinus carpio*) // Biochim. Biophys. Acta, Gene Struct. Expression. 1990. V. 1087. № 1. P. 91–94.
- Das P., Meyer L., Seyfert H.-M. et al. Structure of the growth hormone-encoding gene and its promoter in mice // Gene. 1996. V. 169. № 2. P. 209–213.
- Daza D.O., Larhammar D. Evolution of the growth hormone, prolactin, prolactin 2 and somatolactin family // Gen. Comp. Endocrinol. 2018. V. 264. P. 94–112.
- Deng S.-P., Wu B., Zhu C.-H., Li G.-L. Molecular cloning and dimorphic expression of growth hormone (*gh*) in female and male spotted scat *Scatophagus argus* // Fish. Sci. 2014. V. 80. № 4. P. 715–723.

- DeNoto F.M., Moore D.D., Goodman H.M.* Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing // *Nucleic Acids Res.* 1981. V. 9. № 15. P. 3719–3730.
- Devlin R.H.* Sequence of sockeye salmon type 1 and 2 growth hormone genes and the relationship of rainbow trout with Atlantic and Pacific salmon // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1993. V. 50. № 8. P. 1738–1748.
- Du S.J., Devlin R.H., Hew C.L.* Genomic structure of growth hormone genes in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*): presence of two functional genes, GH-I and GH-II, and a male-specific pseudogene, GH- $\psi$  // *DNA Cell Biol.* 1993. V. 12. № 8. P. 739–751.
- Farchi-Pisanty O., Sternberg H., Moav B.* Transcriptional regulation of fish growth hormone gene // *Fish Physiol. Biochem.* 1997. V. 17. P. 237–246.
- Forbes S.H., Knudsen K.L., North T.W., Allendorf F.W.* One of two growth hormone genes in coho salmon is sex-linked // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. № 5. P. 1628–1631.
- González-Alvarez R., Revol de Mendoza A., Esquivel Escobedo D. et al.* Growth hormone locus expands and diverges after the separation of New and Old World monkeys // *Gene.* 2006. V. 380. № 1. P. 38–45.
- Gordon D.F., Quick D.P., Erwin C.R. et al.* Nucleotide sequence of the bovine growth hormone chromosomal gene // *Mol. Cell. Endocrinol.* 1983. V. 33. № 1. P. 81–95.
- Hirt H., Kimelman J., Birnbaum M.J. et al.* The human growth hormone gene locus: structure, evolution and allelic variations // *DNA.* 1987. V. 6. № 1. P. 59–70.
- Holland L.Z., Albalat R., Azumi K. et al.* The amphioxus genome illuminates vertebrate origins and cephalochordate biology // *Genome Res.* 2008. V. 18. № 7. P. 1100–1111.
- Hong Y., Scharl M.* Sequence of the growth hormone (GH) gene from the silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and evolution of the GH genes in vertebrates // *Biochim. Biophys. Acta, Gene Struct. Expression.* 1993. V. 1174. № 3. P. 285–288.
- Houston R.D., Macqueen D.J.* Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) genetics in the 21<sup>st</sup> century: taking leaps forward in aquaculture and biological understanding // *Anim. Genet.* 2019. V. 50. № 1. P. 3–14.
- Johansen B., Johnsen O.C., Valla S.* The complete nucleotide sequence of the growth-hormone gene from Atlantic salmon (*Salmo salar*) // *Gene.* 1989. V. 77. № 2. P. 317–324.
- Jones B.K., Monks B.R., Liebhaber S.A., Cooke N.E.* The human growth hormone gene is regulated by a multi-component locus control region // *Mol. Cell. Biol.* 1995. V. 15. № 12. P. 7010–7021.
- Kansaku N., Soma A., Furukawa S. et al.* Sequence of the domestic duck (*Anas platyrhynchos*) growth hormone-encoding gene and genetic variation in the promoter region // *Anim. Sci. J.* 2008. V. 79. № 2. P. 163–170.
- Kawauchi H., Moriyama S., Yasuda A. et al.* Isolation and characterization of chum salmon growth hormone // *Arch. Biochem. Biophys.* 1986. V. 244. № 2. P. 542–552.
- Kawauchi H., Suzuki K., Yamazaki T. et al.* Identification of growth hormone in the sea lamprey, an extant representative of a group of the most ancient vertebrates // *Endocrinology.* 2002. V. 143. № 12. P. 4916–4921.
- Kliwer S.A., Umesono K., Heyman R.A. et al.* Retinoid X receptor-COUP-TF interactions modulate retinoic acid signaling // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. V. 89. № 4. P. 1448–1452.
- Kobayashi T., Yasuda A., Yamaguchi K. et al.* The complete amino acid sequence of growth hormone of the bullfrog (*Rana catesbeiana*) // *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1991. V. 1078. № 3. P. 383–387.
- Li M., Gao Z., Ji D., Zhang S.* Functional characterization of GH-like homolog in amphioxus reveals an ancient origin of GH/GH receptor system // *Endocrinology.* 2014. V. 155. № 12. P. 4818–4830.
- Lioupis A., Wallis O.C., Wallis M.* Cloning and characterisation of the gene encoding red deer (*Cervus elaphus*) growth hormone: implications for the molecular evolution of growth hormone in artiodactyls // *J. Mol. Endocrinol.* 1997. V. 19. № 3. P. 259–266.
- Lioupis A., Nevo E., Wallis M.* Cloning and characterisation of the gene encoding mole rat (*Spalax ehrenbergi*) growth hormone // *J. Mol. Endocrinol.* 1999. V. 22. № 1. P. 29–36.
- Male R., Nerland A.N., Lorens J.B. et al.* The complete nucleotide sequence of the Atlantic salmon growth hormone I gene // *Biochim. Biophys. Acta, Gene Struct. Expression.* 1992. V. 1130. № 3. P. 345–348.
- Maniou Z., Wallis O.C., Wallis M.* Episodic molecular evolution of pituitary growth hormone in Cetartiodactyla // *J. Mol. Evol.* 2004. V. 58. № 6. P. 743–753.
- McKay S.J., Devlin R.H., Smith M.J.* Phylogeny of Pacific salmon and trout based on growth hormone type-2 and mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 3 DNA sequences // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1996. V. 53. № 5. P. 1165–1176.
- Moriyama S., Oda M., Takahashi A. et al.* Genomic structure of the sea lamprey growth hormone-encoding gene // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2006. V. 148. № 1. P. 33–40.
- Moriyama S., Oda M., Yamazaki T. et al.* Gene structure and functional characterization of growth hormone in dogfish, *Squalus acanthias* // *Zool. Sci.* 2008. V. 25. № 6. P. 604–613.
- Noso T., Lance V.A., Kawauchi H.* Complete amino acid sequence of crocodile growth hormone // *Gen. Comp. Endocrinol.* 1995. V. 98. № 3. P. 244–252.
- Oakley T.H., Phillips R.B.* Phylogeny of Salmonine fishes based on growth hormone introns: Atlantic (*Salmo*) and Pacific (*Oncorhynchus*) salmon are not sister taxa // *Mol. Phylogenet. Evol.* 1999. V. 11. № 3. P. 381–393.
- Ohkubo T., Araki M., Tanaka M. et al.* Molecular cloning and characterization of the yellowtail GH gene and its promoter: a consensus sequence for teleost and avian Pit-1/GHF-1 binding sites // *J. Mol. Endocrinol.* 1996. V. 16. № 1. P. 63–72.
- Panicz R., Sadowski J., Drozd R.* Genetic and structural characterization of the growth hormone gene and protein from tench, *Tinca tinca* // *Fish Physiol. Biochem.* 2012. V. 38. № 6. P. 1645–1653.
- Pérez-Maya A.A., Wallis M., Barrera-Saldaña H.A.* Structure and evolution of the gorilla and orangutan *growth*

- hormone loci* // Mamm. Genome. 2016. V. 27. № 9–10. P. 511–523.
- Phillips R.B., Matsuoka M.P., Konkol N.R., McKay S. Molecular systematics and evolution of the growth hormone introns in the Salmoninae // Environ. Biol. Fishes. 2004. V. 69. № 1–4. P. 433–440.
- Rajesh R., Majumdar K.C. A comparative account of the structure of the growth hormone encoding gene and genetic interrelationship in six species of the genus *Labeo* // Fish Physiol. Biochem. 2007. V. 33. № 4. art. ID 311. <https://doi.org/10.1007/s10695-007-9164-3>
- Rodríguez-Sánchez I.P., Tejero M.E., Cole S.A. et al. Growth hormone-related genes from baboon (*Papio hamadryas*): characterization, placental expression and evolutionary aspects // Gene. 2010. V. 450. № 1–2. P. 1–7.
- Ryynänen H.J., Primmer C.R. Varying signals of the effects of natural selection during teleost growth hormone gene evolution // Genome. 2006. V. 49. № 1. P. 42–53.
- Saunders M.C., Deakin J., Harrison G.A., Curlewis J.D. cDNA cloning of growth hormone from the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) // Gen. Comp. Endocrinol. 1998. V. 111. № 1. P. 68–75.
- Sekar M., Singh S.D., Gupta S. Cloning and characterization of *Pangasianodon hypophthalmus* growth hormone gene and its heterologous expression // Appl. Biochem. Biotechnol. 2014. V. 173. P. 1446–1468.
- Sekkali B., Brim H., Muller M. et al. Structure and functional analysis of a tilapia (*Oreochromis mossambicus*) growth hormone gene: activation and repression by pituitary transcription factor Pit-1 // DNA Cell Biol. 1999. V. 18. № 6. P. 489–502.
- Sternberg H., Moav B. Regulation of the growth hormone gene by fish thyroid/retinoid receptors // Fish Physiol. Biochem. 1999. V. 20. № 4. P. 331–339.
- Su Y., Liebhaber S.A., Cooke N.E. The human growth hormone gene cluster locus control region supports position-independent pituitary- and placenta-specific expression in the transgenic mouse // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. № 11. P. 7902–7909.
- Tanaka M., Hosokawa Y., Watahiki M., Nakashima K. Structure of the chicken growth hormone-encoding gene and its promoter region // Gene. 1992. V. 112. № 2. P. 235–239.
- Tanaka M., Toma Y., Ohkubo T. et al. Sequence of the flounder (*Paralichthys olivaceus*) growth hormone-encoding gene and its promoter region // Gene. 1995. V. 165. № 2. P. 321–322.
- Valinsky A., Shani M., Gootwine E. Restriction fragment length polymorphism in sheep at the growth hormone locus is the result of variation in gene number // Anim. Biotechnol. 1990. V. 1. № 2. P. 135–144.
- Venkatesh B., Brenner S. Genomic structure and sequence of the pufferfish (*Fugu rubripes*) growth hormone-encoding gene: a comparative analysis of teleost growth hormone genes // Gene. 1997. V. 187. № 2. P. 211–215.
- Von Schalburg K.R., Yazawa R., de Boer J. et al. Isolation, characterization and comparison of Atlantic and Chinook salmon growth hormone 1 and 2 // BMC Genomics. 2008. V. 9. Art. ID 522. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-522>
- Wallis M. Variable evolutionary rates in the molecular evolution of mammalian growth hormones // J. Mol. Evol. 1994. V. 38. № 6. P. 619–627.
- Wallis M. The molecular evolution of vertebrate growth hormones: a pattern of near-stasis interrupted by sustained bursts of rapid change // J. Mol. Evol. 1996. V. 43. № 2. P. 93–100.
- Wallis O.C., Wallis M. Cloning and characterisation of the rabbit growth hormone-encoding gene // Gene. 1995. V. 163. № 2. P. 253–256.
- Wallis O.C., Wallis M. Molecular evolution of growth hormone (GH) in Cetartiodactyla: cloning and characterization of the gene encoding GH from a primitive ruminant, the chevrotain (*Tragulus javanicus*) // Gen. Comp. Endocrinol. 2001. V. 123. № 1. P. 62–72.
- Wallis O.C., Zhang Y.P., Wallis M. Molecular evolution of GH in primates: characterisation of the GH genes from slow loris and marmoset defines an episode of rapid evolutionary change // J. Mol. Endocrinol. 2001. V. 26. № 3. P. 249–258.
- Westrich K.M., Konkol N.R., Matsuoka M.P., Phillips R.B. Interspecific relationships among charrs based on phylogenetic analysis of nuclear growth hormone intron sequences // Environ. Biol. Fishes. 2002. V. 64. № 1–3. P. 217–222.
- Yamada S., Hata J., Yamashita S. Molecular cloning of fish Pit-1 cDNA and its functional binding to promoter of gene expressed in the pituitary // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. № 32. P. 24361–24366.
- Yamaguchi K., Yasuda A., Lewis U.J. et al. The complete amino acid sequence of growth hormone of an elasmobranch, the blue shark (*Prionace glauca*) // Gen. Comp. Endocrinol. 1989. V. 73. № 2. P. 252–259.
- Yamano Y., Abe M., Mikawa S. et al. Structural analysis of repetitive DNA sequences in the goat growth hormone gene region // Agric. Biol. Chem. 1991. V. 55. № 3. P. 633–639.
- Yang B.-Y., Chan K.-M., Lin C.-M., Chen T.T. Characterization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth hormone 1 gene and the promoter region of growth hormone 2 gene // Arch. Biochem. Biophys. 1997. V. 340. № 2. P. 359–368.
- Yasuda A., Yamaguchi K., Papkoff H. et al. The complete amino acid sequence of growth hormone from the sea turtle (*Chelonia mydas*) // Gen. Comp. Endocrinol. 1989. V. 13. № 2. P. 242–251.
- Yowe D.L., Epping R.J. Cloning of the barramundi growth hormone encoding gene: a comparative analysis of higher and lower vertebrate GH genes // Gene. 1995. V. 162. № 2. P. 255–259.
- Yuri T., Kimball R.T., Braun E.L., Braun M.J. Duplication of accelerated evolution and growth hormone gene in passerine birds // Mol. Biol. Evol. 2008. V. 25. № 2. P. 352–361.
- Zhu Z., He L., Chen T.T. Primary-structural and evolutionary analyses of the growth-hormone gene from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) // Eur. J. Biochem. 1992. V. 207. № 2. P. 643–648.

## Fish Growth Hormone Genes: Structure and Divergence

D. N. Kamenskaya<sup>a</sup> and V. A. Brykov<sup>a, 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>*School of Natural Sciences, Far Eastern Federal University, Vladivostok 690012, Russia*

The review provides information about the structure of growth hormone genes (GHG) in fish and the divergence of coding, intron, and adjacent flanking regions; original data, obtained in our laboratory, is also considered. In most fish species, GHG is represented by a single copy, while some of taxonomic groups have two paralogous genes. Coding sequences of GHGs are conservative. The gene length variations depend on the length of non-coding introns and flanking regions. The divergence rate of gene sequences varies not only between different taxonomic groups, but also in time of divergence within groups. In flanking regions, only regulatory elements are conservative.

*Keywords:* growth hormone gene, regulatory regions, divergence

УДК 581.526.323:582.232(262.54)

## БЕНТОСНЫЕ ДИАТОМОВЫЕ ВОДОРОСЛИ РОССИЙСКИХ ВОД ЯПОНСКОГО МОРЯ И СОПРЕДЕЛЬНЫХ АКВАТОРИЙ

© 2020 г. А. А. Бегун<sup>1</sup>, \*, Л. И. Рябушко<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН,  
Севастополь 299011, Россия

\*e-mail: [andreibegun@yandex.ru](mailto:andreibegun@yandex.ru)

Поступила в редакцию 20.08.2019 г.

После доработки 19.12.2019 г.

Принята к публикации 30.01.2020 г.

Рассмотрено современное состояние изученности микрофитобентоса в российских водах Японского моря и прилегающих акваториях. Анализ литературных данных показал, что микрофитобентос играет важную роль в прибрежных морских экосистемах, создавая первичную продукцию, часто превосходящую таковую фитопланктона. В прибрежных водах зал. Петра Великого Японского моря бентосные диатомовые водоросли являются пищей для морских беспозвоночных и млекопитающих животных, а также служат важными индикаторами состояния среды. Несмотря на большое количество опубликованных работ по исследуемому региону, изученность морского микрофитобентоса в таксономическом и эколого-флористическом направлениях все еще недостаточна.

**Ключевые слова:** микрофитобентос, диатомовые водоросли бентоса, перифитон, эпифитон, Японское море

**DOI:** 10.31857/S0134347520040026

Микрофитобентос представляет собой многовидовое сообщество фотосинтезирующих микроорганизмов, поселяющихся на разных субстратах. К их числу относятся живые (донная растительность, поверхность тела млекопитающих и беспозвоночных животных) и неживые (галечник, валуны, скалы, донные осадки) субстраты, а также любые природные и антропогенные субстраты, плавающие в воде или находящиеся на дне водоемов (MacIntyre et al., 1996; Miller et al., 1996; Рябушко, 2013). Основу микрофитобентоса составляют диатомовые водоросли, ведущие индивидуальный или колониальный образ жизни, способные образовывать как макроформы, видимые невооруженным глазом, так и микроскопические формы колоний (Witkowski et al., 2000; Рябушко, 2013). Они относятся к наиболее многочисленной группе одноклеточных водорослей по количеству видов, численности и распространенности во всех биотопах Мирового океана.

Для описания ниш, в которых встречаются диатомовые водоросли, Раунд (Round, 1971) предложил использовать терминологию, принятую для животных и растений. Выделяют следующие экотопы: эпипитон (водоросли, обитающие на поверхности камней), эпипелон (илистых осад-

ков), эпипсаммон (песка), эпифитон (на поверхности донной растительности), эпизоон (на беспозвоночных и млекопитающих животных) и перифитон (на антропогенных субстратах, помещенных в воду человеком или случайно попавших в море).

Диатомовые водоросли существуют с древних времен. В ископаемых комплексах они известны с юрского периода (Kooistra et al., 2006), но разнообразием и хорошей сохранностью — только с мелового периода (Цой, Шастина, 2005). Отдельные находки диатомей специалисты относят к протерозою (Sieminska, 2000). В настоящее время известно около 200 тыс. видов диатомовых водорослей, которые принадлежат к всеветным микроскопическим организмам, встречающимся во всех морских и континентальных водоемах в пелагических и донных экосистемах (Mann, Droop, 1996). Они обитают в холодных водах Арктики и Антарктики, в тропической и умеренных зонах Мирового океана (Мельников, Бондарчук, 1987; Полякова, 1988; Procopiak et al., 2006; Eskinazi-Leça et al., 2010; Рябушко, 2013, 2016; Kauko et al., 2018).

Известно, что диатомовые водоросли участвуют в сложных биогеохимических циклах, оказывая влияние как друг на друга, так и на функционирование всей морской экосистемы (Armbrust, 2009;

Amin et al., 2012). Будучи автотрофами, диатомовые используют миксотрофный и гетеротрофный тип питания, активно ассимилируя органическое вещество из окружающей среды. Это позволяет им обитать в условиях низкой освещенности (Round et al., 1990; Dame et al., 2000), фотосинтезировать круглый год и давать высокую первичную продукцию (Кузнецов, 1991; Витченко, 2005; Geertz-Hansen et al., 2010; Рябушко, 2013; Рябушко и др., 2013, 2014).

В результате адаптации к жизни на дне водоемов у микроводорослей выработался ряд защитных приспособлений, одним из которых является колониальность. Бентосные диатомеи продуцируют межклеточные полимерные вещества, которые позволяют формировать колонии в виде стеблей, кустиков, желатиновых трубок, слизистых пленок, волокнистых и студенистых образований мукополисахаридной природы, играющих важную экологическую роль (Мельников, Бондарчук, 1987; Hoagland et al., 1993).

Значение морского микрофитобентоса как важнейшего автотрофного компонента и первичного продуцента органического вещества в донных экосистемах морей огромно и в целом сопоставимо с ролью фитопланктона пелагиали (Urban-Malinga, Wiktor, 2003). Микрофитобентос вносит существенный вклад в морские экосистемы, являясь неотъемлемым кормовым ресурсом для многих обитателей водной толщи и донных организмов (Argumedo-Hernández et al., 2010; Рябушко, 2009, 2013; Рябушко, Бегун, 2015; Ryabushko et al., 2017). Некоторые исследователи считают, что суммарный вклад микрофитобентоса с фитопланктоном в первичную продукцию биосферы может достигать 90–95% (Hemminga, Duarte, 2000; Рябушко, 2013; Рябушко и др., 2014).

Диатомовые водоросли быстро реагируют на изменение среды обитания и поэтому служат хорошими индикаторами состояния морских водоемов (Trobajo et al., 2004; Рябушко, 2009; Бегун, 2012; Varinova et al., 2019; Рябушко и др., 2019). Таким образом, подобно фитопланктону, микрофитобентос морей является самостоятельным объектом для изучения его биологического разнообразия, фитогеографии и экологии, структурно-функциональных характеристик, продуктивности и пищевых взаимоотношений в системе продуцент–консумент.

Цель настоящего обзора — анализ достижений таксономического и эколого-флористического направлений в изучении бентосных диатомовых водорослей российских вод Японского моря и прилегающих акваторий.

**Краткий обзор состояния изученности микрофитобентоса Мирового океана.** Анализ состояния изученности морских бентосных диатомовых водорослей в разных частях Мирового океана по-

казал, что подавляющее большинство работ (около 90%), опубликованных за два последних десятилетия, посвящено физиологическому, биохимическому, молекулярно-генетическому, палеогеографическому и биостратиграфическому направлениям. Это характерно и для исследований, проводимых в странах, расположенных на побережье Японского моря (Япония, Республика Корея), а также в Китае. Эколого-флористическому и таксономическому направлениям, включающим изучение морфологии, систематики, экологии и продуктивности морского микрофитобентоса, в последние десятилетия посвящено значительно меньше научных работ. Главной причиной этого, в первую очередь, можно считать методические трудности при проведении экспериментальных исследований в природных условиях (отсутствие водолазного снаряжения, квалифицированного персонала и др.). При изучении количественных показателей микрофитобентоса в сезонном и многолетнем аспектах такие трудности связаны с подготовкой различных экспериментальных конструкций, экспонируемых в море, и с длительностью самого эксперимента. Тем не менее, микрофитобентос в этих направлениях исследуют в разных частях мира, включая Японское море со стороны России, Японии и Корейского полуострова.

Изучению биологического разнообразия, систематики и экологии бентосных диатомовых водорослей морского побережья посвящены десятки работ во многих странах мира. Это Северная и Южная Америка, в том числе Канада (Corlett, Jones, 2007), США (McGee, 2009; Besterman, Pase, 2018), Мексика (Siqueiros-Beltrones et al., 2002) и Бразилия (Procopiak et al., 2006; Eskinazi-Leça et al., 2010), острова Атлантического океана — Канарские (Gil-Rodriguez et al., 2003) и Багамские (Hein et al., 2008). Исследования микрофитобентоса ведутся в странах африканского континента (Perissinotto et al., 2002; Sarasvathi et al., 2003) и тихоокеанского региона, включая Филиппины (Martines-Goss, 2001) и Вьетнам (Особенности структуры..., 2006). Изучению таксономии, экологии и флористики морских бентосных диатомей большое внимание уделяют научные сообщества Японии (Kasim, Mukai, 2006; Park et al., 2012), Китая (Liu, 2008; Zhao et al., 2017) и Кореи (Du et al., 2009; Lee et al., 2015).

Опубликованы результаты исследований бентосных диатомовых водорослей Австралии, Новой Зеландии (Wood, 1961; Underwood, 1984), Аравийского (Joseph, Joseph, 1977) и Каспийского морей (Караева, 1999; Караева, Бухтиярова, 2010), а также Индийского океана у берегов Индии (Garg, Bhaskar, 2000; Patil, Anil, 2000) и Кувейта (Al-Yamani, Saburova, 2011). В европейском регионе большинство работ посвящено изучению систематики, флористики, биологии и экологии

бентосных диатомовых водорослей в составе эпифитона, эпизоона и различных донных грунтов. Исследования проведены в Северном (Jones et al., 2005), Белом (Георгиев, 2010; Михайлова и др., 2014), Баренцевом (Витченко, 2005; Михайлова, Штрик, 2007) и Балтийском (Ulanova et al., 2009; Балашова и др., 2016) морях.

Другое направление касается изучения флористики и экологии бентосных диатомовых, обитающих на разнообразных субстратах в Арктическом (Kauko et al., 2018) и Антарктическом (Рябушко, 2016) бассейнах. В результате исследования сообществ морского льда Антарктики обнаружено 150 видов одноклеточных водорослей, в основном диатомовых. Флористические и продукционные исследования микрофитобентоса на природных и искусственных субстратах были выполнены в Адриатическом (Welker et al., 2002; Totti et al., 2007), Эгейском (Рябушко, 2009, 2013) и Средиземном (Тробаю, 2005) морях, включая Суэцкий канал (Zalat, 2002) и Порт-Саид (Рябушко, 2009).

Анализ изученности микрофитобентоса в морях России и стран СНГ показал, что в таксономическом и эколого-флористическом отношении данная группа наиболее полно исследована в акватории Азово-Черноморского бассейна. В первую очередь это связано с тем, что в Институте биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН (г. Севастополь) в начале XX столетия сформировалась научная школа по исследованию диатомовых водорослей, а в настоящее время работает ряд квалифицированных специалистов, изучающих бентосных диатомей. Обобщены результаты многочисленных исследований видового состава микрофитобентоса в разных экотопах Черного моря, в которых обнаружено 1025 видов и внутривидовых таксонов бентосных микроводорослей из восьми отделов и 18 классов (Рябушко, 2013). В данной монографии проанализированы систематический состав, фитогеография, экология, сезонная динамика и продуктивность бентосных диатомовых водорослей. Изучена сезонная и годовая динамика видового состава и количественных характеристик бентосных диатомей в результате экспериментальных исследований эпизоона мидий (Рябушко и др., 2017) и перифитона антропогенных субстратов в крымском побережье Черного моря (Рябушко, 2009; Рябушко и др., 2013). Исследованы также состав и экология диатомовых водорослей бентоса в разных экотопах моря (Прошкина-Лавренко, 1963; Бодяну, 1979; Гусяков и др., 1992; Темнискова-Топалова и др., 1994; Неврова и др., 2003; Герасимюк, Ковтун, 2007; Неврова, Петров, 2007; Рябушко, 2013).

При обобщении литературных данных по микрофитобентосу Азовского моря было указано 200 таксонов микроводорослей, в том числе 108 таксонов, являющихся индикаторами орга-

нического загрязнения вод (Varinova et al., 2019). В последнее десятилетие значительно возрос интерес к изучению донных микроводорослей разных экотопов этого моря, в частности, акваторий, подверженных антропогенному загрязнению (Ковалева, 2006; Бондаренко и др., 2019; Рябушко и др., 2019).

Донные диатомовые водоросли российских вод Японского моря и сопредельных акваторий. Первые исследования диатомовых водорослей дальневосточных морей России, характеризующихся обширной и достаточно масштабной протяженностью, были посвящены таксономии преимущественно ископаемых форм. Это работы, в которых описаны результаты изучения диатомовых фитопланктона Амурского лимана, побережья Камчатки, Сахалина, Курильских островов, Берингова и Японского морей (Гайл, 1950; Киселев, 1953; Семина, Жузе, 1959; Шешукова-Порецкая, 1967; Van Baalen, O'Donnel, 1983). Сведения о диатомовых обрастаниях стеклянных пластин в Тауйской губе (Кашина, 1975), об эпифитоне макрофитов Тугурского залива и северо-западного побережья Охотского моря (Бондарчук, 1979) носили предварительный характер.

Обширные исследования донных диатомовых водорослей были проведены в уникальной экосистеме кальдеры Кратерная морского вулкана Ушишир на Курильских островах (Рябушко, Тарасов, 1989; Старынин и др., 1989; Тарасов, Жирмунский, 1989; Ryabushko, 1998). Комплексное изучение флоры и фауны в зоне активного вулканизма показало, что донные диатомовые водоросли и бактерии формируют мощные альгобактериальные маты в местах выхода горячих и холодных вулканических газогидротермальных вод (Тарасов, 1988). Позднее были получены сведения о видовом составе и эколого-географической структуре диатомовых водорослей термальных источников Курильских островов (145 видов), а также и о-ва Сахалин (125 видов) (Никулина, 2010; Nikulina, Kocielek, 2011).

Необходимо отметить ряд работ, посвященных изучению диатомовых водорослей в осадках Японского моря, в том числе бентосных (Жузе, 1962; Tanimura, 1981; Пушкарь, Черепанова, 2008). В результате исследования осадков газифицирующего поля Дагинской геотермальной системы на побережье Ныйского залива (восточный Сахалин) обнаружена богатая диатомовая флора, включавшая 245 видов и разновидностей, принадлежавших 96 родам (Цой и др., 2019). Кроме этого, изучен ископаемый кремнистый микропланктон из пород осадочного чехла Охотского моря и острого склона Курило-Камчатского желоба с целью определения возраста и реконструкции осадконакопления (Цой, Шастина, 2005). Донные осадки в Японском море исследуют и в настоящее время, о чем свидетельствует работа о со-

временных осадках Амурского залива, в которой представлены диатомовые водоросли и силикофлагелляты (Tsoy et al., 2015). В поверхностных донных осадках Амурского залива выявлен 221 вид, из которых более 120 видов составляли бентосные диатомовые водоросли (Цой, Моисеенко, 2014).

Первые специализированные работы по изучению диатомовых водорослей бентоса в бухтах зал. Петра Великого Японского моря принадлежат Скворцову (Skvortzow, 1932a, 1932b, 1932c); в них содержатся краткие диагнозы видов с указанием субстрата, в основном макрофитов и илов, а также оригинальные рисунки видов. Автором обнаружено 132 вида и внутривидовых таксона диатомовых водорослей, из которых 108 видов являются пеннатными, обитающими на литорали залива.

Наиболее полно систематический состав флоры диатомовых водорослей литорали и sublиторали в бухтах зал. Посъета Японского моря исследован Николаевым (1970, 1976). В ходе работ, проведенных в летний период на субстратах разного типа, обнаружено 273 вида диатомовых, из которых 242 вида были бентосными. При изучении другого важного биотопа моря — глубоководных илов, для зал. Петра Великого Забелиной (1953) приведены сведения о 52 формах современных донных диатомовых водорослей. В поверхностных слоях донных осадков российских вод Японского моря среди диатомовых водорослей отмечены также современные sublиторальные виды (Беляева, 1961; Гребенникова, 1982; Цой, Шастина, 1999). Отрывочные данные о sublиторальных формах диатомовых водорослей в фитопланктоне Японского моря опубликованы в ряде работ (Коновалова, 1984; Паутова, 1984; Орлова и др., 2009; Стоник, 2018).

В конце 70-х и в начале 80-х годов XX века была исследована биологическая структура заливов Восток и Посъета. На Морской биологической станции “Восток” были выполнены комплексные исследования экологии донных сообществ залива (Чербаджи, Тарасов, 1980; Рябушко, 1986). В ряде работ приведены результаты изучения диатомовых водорослей эпифитона анфельции (Челышева, 1955; Каменский, 1972), ламинариевых (Суховеева, 1975; Рябушко, Буянкина, 1982) и цистозир (Ковалевская, 1982; Рябушко, 1986). Было показано, что макрофиты и морские травы активно заселяются бентосными диатомеями, которые используют макрофит как субстрат для поселения, конкурируя с ним топически и трофически (Паймеева, 1975; Лысенко, 1985; Харламенко, 1985).

К этому времени относятся первые работы по изучению качественных и количественных характеристик, первичной продукции и фотосинтеза микрофитобентоса рыхлых и твердых грунтов зал. Восток (Чербаджи и др., 1980; Рябушко, 1986;

Рябушко, Рябушко, 1991), включая экспериментальное исследование обрастания чистых кораллов при их экспозиции в зал. Восток (Чербаджи, Пропп, 1981). Было показано, что валовый фотосинтез донных сообществ микрофитобентоса каменистых грунтов залива в феврале в среднем составлял  $840 \text{ мл O}_2/(\text{м}^2 \text{ сут})$  (Чербаджи и др., 1980), а фотосинтез микрофитобентоса песчаных грунтов летом достигал  $20 \text{ мл O}_2/(\text{м}^2 \text{ ч})$  (Чербаджи, Тарасов, 1980; Рябушко и др., 1981).

В результате флористического исследования диатомовых водорослей в бентосе для северо-западной части Японского моря приведено 148 видов, из них 6 видов — впервые для морей СССР (Рябушко, 1986). Круглогодичное исследование динамики видового состава и количественных характеристик эпипитона в зал. Восток в зависимости от глубины (0.5, 2.5 и 4.5 м) показало весенний максимум численности бентосных диатомей с пиком в марте ( $80 \times 10^3 \text{ кл/см}^2$ ) на глубине 0.5 м (Рябушко, Рябушко, 1991).

Изучение трофических взаимоотношений морских беспозвоночных и объектов их питания — одна из важнейших задач современной гидробиологии. Для решения этой задачи в прибрежье зал. Посъета были проведены эксперименты по определению состава донных диатомовых водорослей в пищеварительной системе дальневосточного трепанга, морских ежей и брюхоногих моллюсков (Бирюлина, 1972; Левин, 1982; Рябушко, 1986). К настоящему времени установлены пищевые спектры морских ежей *Scaphechinus mirabilis* (Agazzis, 1863) и *Echinarachmus parma* (Lamarck, 1818) (см.: Begun, Elkin, 2015). Состав диатомовых водорослей в фекальных комочках свидетельствовал об избирательном характере питания *S. mirabilis* и *E. parma*, а высокое сходство видового состава водорослей указывало на сходство пищевого предпочтения морских ежей.

Начало XXI столетия — новый этап в исследовании морских бентосных диатомовых водорослей в прибрежных акваториях зал. Петра Великого Японского моря. Научным коллективом ННЦМБ ДВО РАН с коллегами из других институтов ДВО РАН впервые были организованы многоплановые экспериментальные работы по многолетнему изучению влияния антропогенного загрязнения на биоразнообразие, экологию и динамику количественного развития разных групп морской биоты (Звягинцев, 2005). При исследовании бентосных диатомовых водорослей в этом эксперименте был использован метод экспериментальных пластин-модулей из разных материалов (оргстекло, древесина, высоколегированная сталь, асбоцемент). В результате круглогодичных работ было показано, что некоторые прибрежные акватории, прилегающие к г. Владивостоку, с высоким уровнем химического, нефтя-

ного и термального загрязнения характеризуются более низкими значениями индексов видового разнообразия микрофитоперифитона и преобладанием диатомовых водорослей — индикаторов высокого органического загрязнения (Бегун, Звягинцев, 2010; Бегун и др., 2010).

Установлено, что численность и биомасса диатомовых водорослей при длительной экспозиции в море на один-два порядка выше, чем при кратковременной. Максимальная численность диатомей отмечена на пластинах из древесины, которая по своим физико-химическим и механическим свойствам ближе к природному органическому материалу. Сделан вывод, что состав доминирующих видов перифитона изменяется в зависимости от сезона года, глубины и экотопа (Бегун и др., 2010). Было также показано, что пионерное сообщество обрастания стеклянных пластин, включая диатомовые водоросли, может быть использовано при круглогодичном мониторинге химико-экологического состояния портовых вод (Звягинцев, 2005).

Диатомовые водоросли могут активно заселять поверхность макрофитов и являются удобной моделью для оценки экологического состояния морских акваторий, подверженных антропогенному прессу (Рябушко и др., 2019). Для бухт зал. Петра Великого Японского моря с разным уровнем антропогенной нагрузки отмечено 112 видов диатомовых водорослей в эпифитоне 25 видов донной растительности (Бегун, 2012, 2013). Показано, что талломы макрофитов осевого типа обрастали эпифитными диатомовыми водорослями в 1.5–3 раза обильнее, чем пластинчатые. В первую очередь это обусловлено гладкостью талломов и выделением ингибирующих веществ ассоциированными с ними бактериями (Rao et al., 2007). Установлено, что у диатомовых водорослей эпифитона имеется индивидуальный отклик на разный тип антропогенного загрязнения (Бегун, 2012).

В связи с риском появления новых видов-вселенцев в особо охраняемых акваториях, что может быть вызвано сбросом балластных вод и увеличением водных транспортных средств, крайне важны мониторинговые работы в районе заповедных мест (Звягинцев и др., 2012). На акватории Дальневосточного морского заповедника ННЦМБ ДВО РАН хорошо изучены видовой состав, а также экология пресноводных микроводорослей и фитопланктона, однако морской микрофитобентос не был исследован. Поэтому в ряде акваторий зал. Посыета, входящих в состав заповедника, недавно было организовано комплексное исследование видового состава, экологии и количественных характеристик микрофитоперифитона, в результате которого впервые приведено 43 вида бентосных диатомовых водорослей (Bегun et al., 2015; Рябушко и др., 2018).

Анализируя состояние изученности микрофитобентоса российских вод Японского моря, нельзя не упомянуть об исследованиях эстуарных сообществ, в которых присутствовала значительная доля морских и эвригаллиных микроводорослей. Такие микрокомпоненты сообществ эстуариев, как эпифитные диатомовые водоросли, вносят важный вклад в формирование первичной продукции эстуарных экосистем и, следовательно, в их функционирование (Kolpakov, 2016). В эстуарии рек Раздольная и Суходол были исследованы видовое разнообразие и эколого-географическая структура эпифитных диатомовых водорослей (Никулина, 2006, 2013), а затем изучено их количественное распределение (Колпаков и др., 2014; Колпаков, Бегун, 2017). Показано, что различия в структуре сообществ эстуарного эпифитона во многом определяются отношением к солености воды массовых видов микроводорослей, а также яркостью расположения макрофитов в толще воды с характерной вертикальной структурой. Кроме того, на структуру эпифитона эстуариев влияют уровень трофности вод и жизненная форма базифита.

Таким образом, несмотря на большое количество научных работ по микрофитобентосу российских вод Японского моря, до 2015 г. отсутствовали обобщающие статьи и систематизированные сводки. В результате были опубликованы монографии (Рябушко, Бегун, 2015, 2016), в которых обобщены собственные и литературные данные о натуральных и экспериментальных исследованиях диатомовых водорослей микрофитобентоса различных экотопов моря, приведены их эколого-флористические и фитогеографические характеристики, а также оценена роль в донных сообществах водоема.

В первом томе (Рябушко, Бегун, 2015) представлены результаты исследований диатомовых водорослей микрофитобентоса, включая литературный обзор о состоянии их изученности в дальневосточных морях России с акцентом на бентосные виды. По данным инвентаризации, отдел Bacillariophyta включает 3 класса, 30 порядков, 49 семейств, 84 рода и 220 видов и внутривидовых таксонов. Показаны пути дальнейшего изучения этой важной и ведущей группы водорослей микрофитобентоса морей Мирового океана.

Во второй том монографии (Рябушко, Бегун, 2016) включены Синописис и Атлас диатомовых водорослей микрофитобентоса. В Синописис вошли аннотации по каждому таксону, включая диапазон размеров, экологическую и фитогеографическую характеристики с обширной библиографической сводкой. Показана встречаемость видов в морях Мирового океана и приведены количественные данные по некоторым видам диатомовых водорослей с иллюстрациями в виде

оригинальных микрофотографий, выполненных в световом (СМ), сканирующем (СЭМ) и трансмиссионном (ТЭМ) электронных микроскопах.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из представленного обзора опубликованных данных, следует, что микрофитобентос российских вод Японского моря и прилегающих акваторий в таксономическом и эколого-флористическом отношении изучен еще недостаточно. Первые научные работы, начиная с 1932 г., в основном касались ископаемых форм диатомовых водорослей, которые могут долговременно сохраняться в донных осадках. С помощью метода диатомового анализа были исследованы фитопланктон и донные осадки Тихого океана, морей Дальнего Востока, включая Берингово, Охотское и Японское, Амурский лиман, побережья Камчатки, Сахалина, Курильских островов и Приморья.

Однако специализированных исследований видового разнообразия, экологии и количественных характеристик бентосных диатомовых водорослей недостаточно; опубликовано лишь несколько статей по заливам Восток, Посыета и некоторым бухтам в районе г. Владивостока. Остальные работы посвящены изучению продукционных характеристик морских экосистем побережья Японского моря, сведения о бентосных диатомовых водорослях ограничены видовыми списками и некоторыми данными о сезонных изменениях обилия.

Кроме того, в ходе проведенных ранее исследований микрофитобентоса многие субстраты остались неизученными. До сих пор не исследовано взаимное влияние микроводорослей планктона и бентоса в мелководных участках Японского моря, что позволило бы выяснить, какую роль играют донные диатомовые водоросли в функционировании прибрежных экосистем. Недостаточно сведений о сезонной динамике популяций и структуре донных сообществ микроводорослей разных экотопов моря, в том числе и на больших глубинах. Поэтому мы полагаем, что представленный обзор собственных и литературных данных о состоянии изучения бентосных диатомовых водорослей российских вод Японского моря и сопредельных акваторий даст новые ориентиры для будущих направлений в исследовании этой важной во многих отношениях группы первичных продуцентов моря.

### 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.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа подготовлена по теме государственного задания ФИЦ ИнБЮМ РАН № 4 АААА-А18-118021350003-6. Культуры микроводорослей поддерживались в ЦКП РК “Морской биобанк” ННЦМБ ДВО РАН.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Балашова Н.Б., Киселев Г.А., Степанова В.А., Тобиас А.В.* Диатомовые водоросли бентоса южного побережья Финского залива (Заказник “Лебяжий”) // Вестн. Санкт-Петербург. ун-та. Сер. 3. Биология. 2016. № 4. С. 9–25.
- Бегун А.А.* Биоиндикационное состояние морской среды по диатомовым водорослям эпифитона макрофитов (залив Петра Великого, Японское море) // Изв. ТИНРО. 2012. Т. 169. С. 1–17.
- Бегун А.А.* Видовой состав *Bacillariophyta* эпифитона макрофитов в заливе Петра Великого (российское побережье Японского моря) // Альгология. 2013. Т. 23. № 3. С. 270–290.
- Бегун А.А., Звягинцев А.Ю.* Биоиндикация качества морской среды по диатомовым водорослям в обрастании антропогенных субстратов // Изв. ТИНРО. 2010. Т. 161. С. 177–198.
- Бегун А.А., Рябушко Л.И., Звягинцев А.Ю.* Влияние поверхности субстрата и времени его экспозиции в море на количественное развитие диатомовых водорослей перифитона // Изв. ТИНРО. 2010. Т. 163. С. 240–263.
- Беляева (Сечкина) Т.В.* Диатомовые в поверхностном слое осадка Японского моря // Тр. ИО АН СССР. 1961. Т. 46. С. 247–262.
- Бирюлина М.Г.* Запасы трепанга в зал. Петра Великого // Вопросы гидробиологии некоторых районов Тихого океана. Владивосток: ДВНЦ АН СССР. 1972. С. 22–32.
- Бодяну Н.* Микрофитобентос // Основы биологической продуктивности Черного моря. Киев: Наукова думка. 1979. С. 109–122.
- Бондаренко А.В., Рябушко Л.И., Садогурская С.А.* Заповедник “Казантипский” (Крым, Азовское море) // Биота и среда заповедных территорий. 2019. № 1. С. 125–131.
- Бондарчук Л.Л.* Некоторые материалы по диатомовым обрастаниям Охотского моря // Экология донного населения шельфовой зоны. М.: Ин-т океанол. АН СССР. 1979. С. 6–8.
- Витченко Т.В.* Структурно-продукционные характеристики морского микрофитобентоса литоральной зоны Восточного Мурмана: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Москва. 2005. 25 с.
- Гайл Г.И.* Определитель фитопланктона Японского моря // Изв. ТИНРО. 1950. Т. 33. С. 3–177.

- Георгиев А.А. Эпифитные диатомовые водоросли макрофитов пролива Великая Салма (Кандалакшский залив, Белое море): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Москва. 2010. 23 с.
- Герасимюк В.П., Ковтун О.А. Микроскопические водоросли Тилигульского лимана (Черное море, Украина) // Альгология. 2007. Т. 17. № 1. С. 42–52.
- Гребенникова Т.А. Диатомовые водоросли в современных осадках южной части Японского моря // Современное осадконакопление и четвертичный морфолитогенез Дальнего Востока. Владивосток: ДВНЦ АН СССР. 1982. С. 90–99.
- Гусяков Н.Е., Загордонец О.А., Герасимюк В.П. Атлас диатомовых водорослей бентоса северо-западной части Черного моря и прилегающих водоемов. Киев: Наукова думка. 1992. 109 с.
- Жузе А.П. Стратиграфические и палеогеографические исследования в северо-западной части Тихого океана. М.: Наука. 1962. 258 с.
- Забелина М.М. Диатомовые водоросли и кремневые жгутиковые илов залива Петра Великого // Диатомовый сб. ЛГУ. 1953. С. 180–185.
- Звягинцев А.Ю. Морское обрастание в северо-западной части Тихого океана. Владивосток: Дальнаука. 2005. 432 с.
- Звягинцев А.Ю., Ивин В.В., Кашин И.А. и др. Чужеродные виды в Дальневосточном морском государственном биосферном заповеднике // Изв. ТИНРО. 2012. Т. 170. С. 60–81.
- Каменский Л.Ф. Состояние зарослей анфельции в бухтах Троица, Андреева и заливе Славянском // Изв. ТИНРО. 1972. Т. 81. С. 259–261.
- Караева Н.И. Bacillariophyta Каспийского моря // Альгология. 1999. Т. 9. № 2. С. 54.
- Караева Н.И., Бухтиярова Л.Н. Дополнение к флоре Bacillariophyta Каспийского моря // Альгология. 2010. Т. 20. № 4. С. 471–481.
- Кашина В.А. Диатомовые водоросли обрастаний экспериментальных пластин Тауйской губы Охотского моря (предварительное сообщение) // Обрастания в Японском и Охотском морях. Владивосток: ДВНЦ АН СССР. 1975. С. 180–183.
- Киселев И.А. Периодичность планктонных водорослей одной из гаваней Японского моря // Диатомовый сб. ЛГУ. 1953. С. 173–179.
- Ковалева Г.В. Микроводоросли бентоса, перифитона и планктона прибрежной части Азовского моря: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Санкт-Петербург. 2006. 19 с.
- Ковалевская Р.А. Сезонная смена эпифитов цистозиры толстоногой *Cystoseira crassipes* (Turn.) Ag. (Phaeophyta, Fucales) // Изв. ТИНРО. 1982. Т. 106. С. 154–158.
- Колпаков Н.В., Бегун А.А. Фитопланктон и эпифитон разнотипных эстуариев (реки Раздольная и Суходол, залив Петра Великого, Японское море) // Вода: химия и экология. 2017. № 4. С. 37–47.
- Колпаков Н.В., Бегун А.А., Ольховик А.В. Состав и распределение микроводорослей в эстуарии реки Суходол (Уссурийский залив, залив Петра Великого) в осенний период. 2. Эпифитон // Изв. ТИНРО. 2014. Т. 176. С. 127–138.
- Коновалова Г.В. Видовой состав фитопланктона залива Восток // Гидробиологические исследования заливов и бухт Приморья. Владивосток: ДВНЦ АН СССР. 1984. С. 93–98.
- Кузнецов Л.Л. Продукция микрофитобентоса в прибрежной зоне Баренцева моря // Продукционно-деструкционные процессы пелагиали побережья Баренцева моря. Апатиты: Изд-во КНЦ АН СССР. 1991. С. 55–62.
- Левин В.С. Дальневосточный трепанг. Владивосток: ДВНЦ АН СССР. 1982. 191 с.
- Лысенко В.Н. Продукция макрофитобентоса сообщества *Zostera marina* L. в северо-западной части Японского моря: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток. 1985. 20 с.
- Мельников И.А., Бондарчук Л.Л. К экологии массовых скоплений колониальных диатомовых водорослей под арктическим дрейфующим льдом // Океанология. 1987. Т. 27. № 2. С. 317–321.
- Михайлова Т.А., Штрик В.А. Микроэпифиты *Laminaria hyperborea* (Laminariaceae) Баренцева и Белого морей // Бот. журн. 2007. Т. 92. № 12. С. 1817–1829.
- Михайлова Т.А., Малавенда С.С., Халаман В.В. Видовой состав водорослей на коллекторах для выращивания мидий в Белом море // Вестн. Мурман. гос. техн. ун-та. 2014. Т. 17. № 1. С. 157–164.
- Неврова Е.Л., Ревков Н.К., Петров А.Н. Микрофитобентос // Современное состояние биоразнообразия прибрежных вод Крыма (Черноморский сектор). Севастополь: ИнБЮМ НАН Украины. 2003. С. 270–362.
- Неврова Е.Л., Петров А.Н. Сравнительный анализ таксономического разнообразия диатомовых бентоса в различных регионах Черного моря // Мор. экол. журн. 2007. Т. 4. № 4. С. 43–54.
- Николаев В.А. Диатомовые водоросли бентоса залива Посыет Японского моря: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Ленинград. 1970. 17 с.
- Николаев В.А. Вертикальное распределение бентосных диатомовых водорослей в заливе Посыета // Прибрежные сообщества дальневосточных морей. Владивосток: ИБМ ДВО РАН. 1976. № 6. С. 94–98.
- Никулина Т.В. Оценка экологического состояния реки Раздольной (Приморье, Россия) по составу индикаторных видов водорослей // Вестн. ДВО РАН. 2006. № 6. С. 71–78.
- Никулина Т.В. Водоросли горячих источников Курильских островов (Россия) // Альгология. 2010. Т. 20. № 3. С. 334–356.
- Никулина Т.В. Видовое разнообразие водорослей эпифитона макрофитов и трав в эстуарии р. Суходол (Приморье) // Жизнь пресных вод. Вып. 1. Владивосток: Дальнаука. 2013. С. 49–60.
- Орлова Т.Ю., Стоник И.В., Шевченко О.Г. Флора микроводорослей планктона Амурского залива Японского моря // Биол. моря. 2009. Т. 35. № 1. С. 48–61.
- Особенности структуры и функционирования прибрежных экосистем Южно-Китайского моря (на примере сообществ залива Нячанг). М.; Ханой: ГЕОС. 2006. 280 с.
- Паймеева Л.Г. Обрастания зостеры Японского моря // Изв. ТИНРО. 1975. Т. 98. С. 193–198.

- Паутова Л.А.* Видовой состав фитопланктона пролива Старка (залив Петра Великого) // Гидробиологические исследования заливов и бухт Приморья. Владивосток: ДВНЦ АН СССР. 1984. С. 99–103.
- Полякова Е.И.* Диатомеи арктических морей СССР и их значение при исследовании донных осадков // Океанология. 1988. Т. 28. № 2. С. 286–292.
- Прошкина-Лавренко А.И.* Диатомовые водоросли бентоса Черного моря. М.; Л.: Наука. 1963. 243 с.
- Пушкарь В.С., Черепанова М.В.* Диатомовые комплексы и корреляция четвертичных отложений северо-западной части Тихого океана. Владивосток: Дальнаука. 2008. 174 с.
- Рябушко В.И., Тарасов В.Г., Чербаджи И.И., Рябушко Л.И.* Дыхание плоских морских ежей в сообществе подвижных сестонофагов // Биол. моря. 1981. № 5. С. 60–65.
- Рябушко Л.И.* Диатомовые водоросли верхней сублиторали северо-западной части Японского моря: Дис. ... канд. биол. наук. Севастополь. 1986. 244 с.
- Рябушко Л.И.* Микрофитобентос Черного моря: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Севастополь: ИнБЮМ НАНУ. 2009. 44 с.
- Рябушко Л.И.* Микрофитобентос Черного моря. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика. 2013. 416 с.
- Рябушко Л.И.* Состояние изученности микрофитобентоса Аргентинских островов Южного океана (Антарктика). Природная среда Антарктики: современное состояние изученности: Материалы II Международ. научно-практ. конф. ГНПО "Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам". 2016. С. 307–311.
- Рябушко Л.И., Балычева Д.С., Поповичев В.Н. и др.* Продукционные характеристики фитоперифитона экспериментальных стеклянных пластин и фитопланктона в Карантинной бухте (крымское побережье Черного моря) // Альгология. 2014. Т. 24. № 4. С. 504–517.
- Рябушко Л.И., Балычева Д.С., Стрижак А.В.* Диатомовые эпифитона некоторых видов зеленых водорослей-макрофитов и перифитона антропогенных субстратов крымского побережья Черного моря // Альгология. 2013. Т. 23. № 4. С. 419–437.
- Рябушко Л.И., Балычева Д.С., Поспелова Н.В., Бегун А.А.* Диатомовые водоросли (Bacillariophyta) микрофитобентоса и фитопланктона особо охраняемых природных акваторий в побережье Черного и Японского морей // Биота и среда заповедных территорий. 2018. № 4. С. 5–24.
- Рябушко Л.И., Бегун А.А.* Диатомовые водоросли микрофитобентоса Японского моря. Т. 1. Севастополь–Симферополь: Н. Орианда. 2015. 288 с.
- Рябушко Л.И., Бегун А.А.* Диатомовые водоросли микрофитобентоса Японского моря (Синописис и Атлас). Севастополь: ПК "КИА". 2016. 323 с.
- Рябушко Л.И., Бондаренко А.В., Баринова С.С.* Индикаторные микроводоросли бентоса в оценке степени органического загрязнения вод на примере крымского побережья Азовского моря // Мор. биол. журн. 2019. Т. 4. № 3. С. 69–80.
- Рябушко Л.И., Буянкина С.К.* Диатомовые обрастания ламинарии японской, культивируемой в Приморье // Биология шельфовых зон Мирового океана: Тез. докл. 2-й Всесоюз. конф. по морской биологии. Владивосток: ДВНЦ АН СССР. 1982. Ч. 3. С. 91–92.
- Рябушко Л.И., Поспелова Н.В., Балычева Д.С. и др.* Микроводоросли эпизоона культивируемого моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam., фитопланктон и гидролого-гидрохимические характеристики акватории мидийно-устричной фермы (Севастополь, Черное море) // Мор. биол. журн. 2017. Т. 2. № 4. С. 67–83.
- Рябушко Л.И., Рябушко В.И.* Структура сообщества диатомовых водорослей твердых грунтов верхней сублиторали залива Восток Японского моря // Биол. моря. 1991. № 3. С. 14–21.
- Рябушко Л.И., Тарасов В.Г.* Качественный состав диатомовых водорослей микрофитобентоса бухты Кратерной // Биол. моря. 1989. № 3. С. 83–88.
- Рябушко Л.И., Фирсов Ю.К., Лохова Д.С., Еремин О.Ю.* Состав, количественные и продукционные характеристики фитоперифитона стеклянных пластин при разных сроках экспозиции в Черном море // Альгология. 2013. Т. 23. № 1. С. 65–81.
- Семина Г.И., Жузе А.П.* Диатомовые водоросли в биоценозах и танатоценозах западной части Берингова моря // Тр. ИО АН СССР. 1959. Т. 30. С. 52–67.
- Старынин Д.А., Горленко В.М., Иванов М.В. и др.* Альгобактериальные маты бухты Кратерной // Биол. моря. 1989. № 3. С. 70–77.
- Стоник И.В.* Качественный и количественный состав фитопланктона бухты Золотой Рог Японского моря // Изв. ТИНРО. 2018. Т. 194. С. 167–174.
- Суховеева М.В.* Эпифиты ламинариевых дальневосточных морей // Изв. ТИНРО. 1975. Т. 98. С. 184–192.
- Тарасов В.Г.* Метаболизм донных сообществ в зонах газогидротермальной деятельности вулкана Ушишир в бухте Кратерная (Курильские острова) // 3-я Всесоюз. конф. по морской биологии: Тез. докл. (Севастополь, 18–20 окт. 1988). Киев. 1988. Ч. 2. С. 40.
- Тарасов В.Г., Жирмунский А.В.* Исследование экосистемы бухты Кратерной (Курильские острова) // Биол. моря. 1989. № 3. С. 4–12.
- Темнискова-Топалова Д., Петрова-Караджова В., Валева М.Т.* Таксономический состав бентосных водорослей (Bacillariophyta) Болгарского шельфа Черного моря // Альгология. 1994. Т. 4. № 2. С. 39–47.
- Харламенко В.И.* Деструкция органических соединений микроорганизмами прибрежных экосистем: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток. 1985. 23 с.
- Цой И.Б., Шастина В.В.* Кремнистый микропланктон неогена Японского моря (диатомеи и радиолярии). Владивосток: Дальнаука. 1999. 241 с.
- Цой И.Б., Шастина В.В.* Кайнозойский кремнистый микропланктон из отложений Охотского моря и Курило-Камчатского желоба. Владивосток: Дальнаука. 2005. 181 с.
- Цой И.Б., Моисеенко И.А.* Диатомеи поверхностных осадков Амурского залива Японского моря // Биол. моря. 2014. Т. 40. № 1. С. 12–25.

- Цой И.Б., Акулова Э.А., Сорочинская А.В. Диатомовые водоросли из осадков геотермальной системы Даги (Восточный Сахалин) // *Вопр. соврем. альгологии*. 2019. Т. 20. № 2. С. 274–278.
- Чельшева Э.А. Обрастания анфельции в заливе Петра Великого // *Изв. ТИНРО*. 1955. Т. 43. С. 69–77.
- Чербаджи И.И., Пронн М.В., Рябушко В.И., Погребов В.Б. Фотосинтез и дыхание донных сообществ на твердых грунтах залива Восток (Японское море) // *Биол. моря*. 1980. № 4. С. 46–53.
- Чербаджи И.И., Пронн М.В. Сравнительная характеристика продукционных показателей кораллов и перифитона искусственных и естественных субстратов // *Биол. моря*. 1981. № 4. С. 31–35.
- Чербаджи И.И., Тарасов В.Г. Фотосинтез и дыхание донных сообществ на мягких грунтах залива Восток (Японское море) // *Биол. моря*. 1980. № 2. С. 21–30.
- Шешукова-Порецкая В.С. Неогеновые морские диатомовые водоросли Сахалина и Камчатки. Л.: Ленингр. гос. ун-т. 1967. 426 с.
- Al-Yamani F.Y., Saburova M.A. Illustrate Guide on the Benthic Diatoms of Kuwait's Marine Environment. Safar, Kuwait: Kuwait Inst. Sci. Res. 2011. 352 p.
- Amin S.A., Parker M.S., Armbrust E.V. Interactions between Diatoms and Bacteria // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012. V. 76. № 3. P. 667–684.
- Argumedo-Hernández U., Siqueiros-Beltrones D.A., M. del Pilar Sanchez-Saavedra. Non-selective in situ grazing of diatoms by juvenile green abalone (*Haliotis fulgens* Philippi, 1945) in the Baja California Peninsula // *Hydrobiologica*. 2010. V. 20. № 1. P. 13–19.
- Armbrust E.V. The life of diatoms in the world's oceans // *Nature*. 2009. № 459. P. 185–192.
- Barinova S., Bondarenko A., Ryabushko L., Kapranov S. Microphytobenthos as an indicator of water quality and organic pollution in the western coastal zone of the Sea of Azov // *Oceanol. Hydrobiol. Stud.* 2019. V. 48. № 2. P. 125–139.  
<https://doi.org/10.2478/ohs-2019-0013>
- Begun A.A., Elkin Y.N. The Role of Diatoms in Feeding of Clypeasteroids *Scaphechinus mirabilis* and *Echinarachmus parma* (Echinoidea, Clypeasteroidea) // *Int. J. Algae*. 2015. V. 17. № 3. P. 263–273.
- Begun A.A., Ryabushko L.I., Zvyagintsev A.Yu. Bacillariophyta of periphyton of navigation buoys in the Posiet Bay area (the Sea of Japan, Russia) // *Int. J. Algae*. 2015. V. 17. № 1. P. 23–37.
- Besterman A., Pase M.L. Do Macroalgal Mats Impact Microphytobenthos on Mudflats? Evidence from a Meta-Analysis, Comparative Survey, and Large-Scale Manipulation // *Estuaries Coasts*. 2018. V. 4. № 8. P. 2304–2316.
- Corlett H., Jones B. Epiphyte communities on *Thalassia testudinum* from Grand Cayman, British West Indies: Their composition, structure, and contribution to lagoonal sediments // *Sediment. Geol.* 2007. V. 194. P. 245–262.
- Dame R., Bushek D., Allen D. et al. The experimental analysis of tidal creeks dominated by oyster reefs: the pre-manipulation year // *J. Shellfish Res.* 2000. V. 19. № 1. P. 361–369.
- Du G.Y., Son M., Yun M. et al. Microphytobenthic biomass and species composition in intertidal flats of the Nakdong River estuary, Korea // *Estuarine, Coastal Shelf Sci.* 2009. V. 82. № 4. P. 663–672.
- Eskinazi-Leça E., Gonçalves da Silva Cunha, M. da G. Santiago et al. Bacillariophyceae // *Catálogo de plantas e fungos do Brasil*. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio; Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2010. V. 1. P. 262–309.
- Garg A., Bhaskar P.V. Fluxes of diatoms in the Dona Paula Bay, west coast of India // *J. Plankton Res.* 2000. V. 44. P. 47–56.
- Gil-Rodríguez M.C., Haroun R., Rodríguez O. Lista de especies marinas de Canarias (algas, hongos, plantas y animales) 2003. Las Palmas: Consejería de Política Territorial y Medio Ambiente del Gobierno de Canarias. 2003. P. 5–30.
- Geertz-Hansen O., Montes C., Duarte C.M. et al. Ecosystem metabolism in a temporary Mediterranean marsh (Doñana National Park, SW Spain) // *Biogeosci. Discuss.* 2010. V. 7. P. 6495–6521.
- Hein M.K., Winsborough B.M., Sullivan M.J. Bacillariophyta (Diatoms) of the Bahamas, Iconographia Diatomologia / Ed. H. Lange-Bertalot. Gantner Verlag, 2008. V. 19. 303 p.
- Hemminga M.A., Duarte C.M. Seagrass Ecology. Cambridge: Cambridge Univ. Press. 2000. 298 p.
- Hoagland K.D., Rosowski J.R., Gretz M.R., Roemer S.C. Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry, and physiology // *J. Phycol.* 1993. V. 29. P. 537–566.
- Jones H.M., Simpson G.E., Stickle A.J., Mann D.G. Life history and systematics of *Petroneis* (Bacillariophyta), with special reference to British waters // *Europ. J. Phycol.* 2005. V. 40. P. 61–87.
- Joseph M.M., Joseph S. Interstitial euglenoids and diatoms causing colouration of Mangalore beach sand during low tides // *Indian J. Mar. Sci.* 1977. V. 6. № 2. P. 179–180.
- Kauko H.M., Olsen L.M., Duarte P. et al. Algal colonization of young Arctic sea ice in spring // *Front. Mar. Sci.* 2018. V. 5. Article 199. doi ., 2018.00199  
<https://doi.org/10.3389/fmars>
- Kasim M., Mukai H. Contribution of benthic and epiphytic diatoms to clam and oyster production in the Akkeshiko Estuary // *J. Oceanogr.* 2006. V. 62. P. 267–281.
- Kolpakov N.V. Fish production in estuaries of Primorye // *Russ. J. Mar. Biol.* 2016. V. 42. № 7. P. 551–567.
- Kooistra W.H.C.F., Chepurnov V., Medlin L.K. et al. The phylogeny of the diatoms. Plant Genome: Biodiversity and Evolution. A.K. Sharma, A. Sharma, eds. Enfield, NH, Science Publishers. 2006. P. 117–178.
- Lee S.D., Yun S.M., Park J.S., Lee J.H. Floristic survey of diatom in the three Islands (Baeknyeong, Daecheong, Socheong) from Yellow Sea of Korea // *J. Ecol. Environ.* 2015. V. 38. № 4. P. 563–598.
- Liu J.Y. Checklist of Biota of Chinese Seas. Beijing: Science Press, Academia Sinica. 2008. 1267 p.
- MacIntyre H.L., Geider R.J., Miller D.C. Microphytobenthos: The ecological role of the “secret garden” of unvegetated, shallow-water marine habitats. I. Distribution, abundance and primary production // *Estuaries, Coasts*. 1996. V. 19. № 2. P. 186–201.

- Mann D.G., Droop S.J.M. Biodiversity, biogeography and conservation of diatoms // *Hydrobiologia*. 1996. V. 366. P. 19–32.
- Martines-Goss M.R. A Checklist of *Navicula* (Class Bacillariophyceae) of the Philippines // *Sci. Diliman*. 2001. V. 13. № 1. P. 1–22.
- McGee D.K. Morphologic comparisons of shallow and deepwater marine diatoms of Onslow Bay, North California // Master of Science Thesis. Univ. of North Carolina at Wilmington. 2009. <https://libres.uncg.edu/ir/uncw/listing.aspx?id=1581>
- Miller D.C., Geider H.L., MacIntyre H.L. The ecological role of the “secret garden” of unvegetated, shallow-water marine habitats. II. Role in sediment stability and shallow-water food webs // *Estuaries*. 1996. V. 19. P. 202–212.
- Nikulina T.V., Kociolek J.P. Diatoms from hot springs from Kuril and Sakhalin Islands (Far East, Russia) // *The Diatom World*. 2011. V. 19. P. 333–363.
- Park J., Khim J.S., Ohtsuka T. et al. Diatom assemblages on Nanaura mudflat, Ariake Sea, Japan: with reference to the biogeography of marine benthic diatoms in North-east Asia // *Botanical Stud.* 2012. V. 53. P. 105–124.
- Patil J.S., Anil A.S. Epibiotic community of the horseshoe crab *Tachypleus gigas* // *Mar. Biol.* 2000. V. 136. № 4. P. 699–713.
- Perissinotto R., Kibirige I., Nozais K. Spatio-temporal Dynamics of Phytoplankton and Microphytobenthos in a South African Temporarily-open Estuary // *Estuarine, Coastal Shelf Sci.* 2002. V. 55. № 1. P. 47–58.
- Procopiak L.K., Fernandes L.F., Moreira-Filho H. Marine and estuarine diatoms (Bacillariophyta) from Paraná, Southern Brazil: check-list with emphasis of harmful species // *Biota Neotrop.* 2006. V. 6. № 3. P. 3–28.
- Rao D., Webb J.S., Holmström C. Low densities of epiphytic bacteria from the marine alga *Ulva australis* inhibit settlement of fouling organisms // *Appl. Env. Microbiol.* 2007. V. 73. № 24. P. 7844–7852.
- Round F.E. Benthic marine diatoms // *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 1971. V. 9. P. 83–139.
- Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G. The Diatoms: Biology and Morphology of the Genera. Cambridge: Cambridge Univ. Press. 1990. 747 p.
- Ryabushko L.I. The influence of hydrothermal vents on the microphytobenthos composition of marine volcano Ushishir (Kurile Islands): Program & Abstr. EMBS<sup>33</sup> Symp. (Wilhelmshaven, 07–11 Sept. 1998). Wilhelmshaven, Germany. 1998. P. 33.
- Ryabushko L.I., Balycheva D.S., Ryabushko V.I. Microphytobenthos diatoms of the Black Sea: biodiversity and ecology // *Ecologica Montenegrina*. 2017. V. 14. P. 48–59.
- Sarasvathi M., Perissinotto R., Nozais C. Seasonal Variations in the Vertical Distribution of Benthic Microalgae in the Upper Sediment of the Mloti Estuary, South Africa // *Bot. Mar.* 2003. V. 46. P. 323–331.
- Sieminska J. The discoveries of diatoms older than the Cretaceous: 55–74 // *The Origin and Biogeographical Approaches*. W. Szafer Institute of Botany Polish Academy of Sciences, Krakow, 2000. P. 55–74.
- Siqueiros-Beltrones D.A., Zaragoza E., Argumedo-Hernández U. Epiphytic diatoms of *Macrocystis pyrifera* (L.) C. AG. from the Baja California Peninsula, México // *Oceanides*. 2002. V. 17. № 1. P. 31–39.
- Skvortzow B.W. Marine littoral diatoms from environs of Vladivostok // *Philippine J. Sci.* 1932a. V. 47. № 1. P. 129–150.
- Skvortzow B.W. Marine diatoms from Formosa Striat // *Philipp. J. Sci.* 1932b. V. 47. № 1. P. 151–160.
- Skvortzow B.W. Diatoms from the bottom of the Sea of Japan // *Philipp. J. Sci.* 1932c. V. 47. № 2. P. 265–277.
- Tanimura Y. Late Quaternary diatoms of the Sea of Japan // *Tohoku Univ. Sci. Rep. 2<sup>nd</sup> Ser. (Geol.)*. 1981. V. 51. № 1–2. P. 1–37.
- Totti C., De Stefano M., Pennesi S. Seasonal variation of epilithic diatoms on different hard substrates, in the northern Adriatic Sea // *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 2007. V. 87. P. 649–658.
- Trobajo R.P. Ecological analysis of periphytic diatoms in Mediterranean coastal wetlands (Emporda wetlands, NE Spain). De Girona Univ. 2005. 212 p.
- Trobajo R.P., Cox E.J., Quintana X.D. The effects of some environmental variables on the morphology of *Nitzschia frustulum* (Bacillariophyta), in relation its use as a bioindicator // *Nova Hedwigia*. 2004. V. 79. № 3–4. P. 433–445.
- Tsoy I., Prushkovskaya I., Aksentov K., Astakhov A. Environmental changes in the Amur Bay (Japan/East Sea) during the last 150 years revealed by examination of diatoms and silicoflagellates // *Ocean Sci. J.* 2015. V. 50. № 2. P. 433–444.
- Ulanova A., Busse S., Snoeijls P. Coastal diatom-environment relationship in the Brackish Baltic Sea // *J. Phycol.* 2009. V. 45. P. 54–69.
- Underwood A.J. The vertical distribution and seasonal abundance of intertidal microalgae on a rocky shore in New South Wales // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1984. V. 78. № 3. P. 199–220.
- Urban-Malinga B., Wiktor J. Microphytobenthic primary production along a non-tidal sandy beach gradient: An annual study from the Baltic Sea // *Oceanologia*. 2003. V. 45. № 4. P. 705–720.
- Van Baalen C., O'Donnel R. Isolation and a growth of psychrophilic diatoms from the ice-edge in the Bering Sea // *J. Gen. Microbiol.* 1983. V. 129. № 3. P. 1019–1023.
- Welker S., Sdrigotti E., Covelli S., Covelli J. Microphytobenthos in the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea); relationship with labile sedimentary organic matter and nutrients // *Estuarine, Coastal Shelf Sci.* 2002. V. 55. P. 336–341.
- Witkowski A., Lange-Bertalot H., Metzeltin D. Diatom Flora of Marine Coasts. I. A.R.G. Gantner Verlag K.G. 2000. 925 p.
- Wood E.J.F. Studies on Australian and New Zealand diatoms. IV. Descriptions of further sedentary species // *Trans. Roy. Soc. N. Z.* 1961. V. 88. Part 4. P. 669–712.
- Zalat A.A. Distribution and origin of diatoms in the bottom sediments of the Suez canal lakes and adjacent areas, Egypt // *Diat. Res.* 2002. V. 17. № 1. P. 243–266.
- Zhao L., Sun J., Gao Y. et al. *Hippodonia fujiannensis* sp. nov. (Bacillariophyceae), a new epipsammic diatom from the low intertidal zone, Fujian province, China // *Phytotaxa*. 2017. V. 295. № 1. P. 77–85.

**Benthic Diatoms of the Russian Waters of the Sea of Japan and Adjacent Sea Areas****A. A. Begun<sup>a</sup> and L. I. Ryabushko<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>*A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol 299011, Russia*

The review analyzes the current state of knowledge of microphytobenthos in the Russian waters of the Sea of Japan and adjacent sea areas. A retrospective analysis of the literature shows that microphytobenthos with its primary production, often exceeding production of phytoplankton, plays an important role in coastal marine ecosystems. Benthic diatoms in the coastal waters of Peter the Great Bay (Sea of Japan), the first food object for many marine invertebrates and mammals, are also used as important indicators of the state of the aquatic environment. Despite a great number of publications on the region under study, knowledge of the microphytobenthos in taxonomic and ecological-floristic aspects is still insufficient.

*Keywords:* microphytobenthos, benthic diatoms, periphyton, epiphyton, Sea of Japan

УДК 582.28:597.2(265.4)

## МИКОБИОТА ДАЛЬНЕВОСТОЧНОЙ НАВАГИ *ELEGINUS GRACILIS* (TILESIUS, 1810) И АЗИАТСКОЙ КОРЮШКИ *OSMERUS MORDAX DENTEX* STEINDACHNER & KNER, 1870 В ЗАЛИВЕ ПЕТРА ВЕЛИКОГО ЯПОНСКОГО МОРЯ

© 2020 г. Л. В. Зверева<sup>1</sup>, \*, О. Г. Борзых<sup>1</sup>

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

\*e-mail: zvereva\_lv@mail.ru

Поступила в редакцию 17.04.2019 г.

После доработки 02.12.2019 г.

Принята к публикации 30.01.2020 г.

В результате микологического обследования в кожных покровах и во внутренних органах дальневосточной наваги *Eleginus gracilis* и азиатской корюшки (зубатки) *Osmerus mordax dentex* из Амурского залива Японского моря выделено 105 изолятов мицелиальных грибов (соответственно 31 и 74 изолята). У дальневосточной наваги обнаружено три вида мицелиальных грибов: *Aspergillus flavus* Link, *Penicillium brevicompactum* Dierckx и *Phialophorophoma* sp.; у азиатской корюшки — шесть видов: *Aspergillus wentii* Wehmer, *Aspergillus* sp., *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries, *Penicillium albidum* Sopp., *Penicillium nigricans* (Bain.) Thom и *Humicola grisea* Traaen. Все они представляли анаморфные стадии сумчатых грибов. У дальневосточной наваги наиболее заселенными грибами органами были жабры (три вида грибов), в мышцах и печени обнаружено по два вида грибов, в кожных покровах и гонадах — по одному виду. У азиатской корюшки распределение грибов было иным: в кожных покровах обнаружено четыре вида грибов, в жабрах — три вида, в мышцах и на плавниках — по два вида, в печени и гонадах — по одному виду.

**Ключевые слова:** морские мицелиальные грибы, дальневосточная навага *Eleginus gracilis*, азиатская корюшка *Osmerus mordax dentex*, залив Петра Великого, Японское море

DOI: 10.31857/S0134347520040105

Проблема микобиотического заражения рыб постоянно возникает в практике рыболовства и при искусственном воспроизводстве рыбных ресурсов как в аквакультуре, так и при разработке биотехнологий получения рыбопродукции. Контроль состояния рыб является неотъемлемой частью разных направлений современной аквариумистики, включая содержание и разведение рыб в океанариумах.

Хорошо известны инфекционные болезни (микозы) рыб. Они вызываются грибными организмами разного филогенетического статуса. Это могут быть сапролегниозы, бранхиомикозы, ихтиофноз, кандидомикоз, а также микотоксикозы (афлатоксикозы, фузариотоксикозы, охратоксикозы и др.). Причиной заболеваний являются грибные токсины, попадающие в организм рыб при поедании ими корма, зараженного микроскопическими грибами (Neish, Hughes, 1980; Noga, 1990; Исаева и др., 1995; Головина др., 2003). Исследования патогенных и токсинообразующих грибов, заселяющих внутренние органы промыс-

ловых видов рыб, необходимы для безопасного использования рыбы в пищу и для предотвращения токсикологических инфекций людей. Это особенно актуально с вступлением России во Всемирную торговую организацию (ВТО), где существуют жесткие требования к регламентации рыбопродукции на содержание патогенных микроорганизмов и их токсинов.

В дальневосточном регионе России ресурсными объектами служат многие виды морских рыб, в том числе дальневосточная навага *Eleginus gracilis* (Tilesius, 1810) и азиатская корюшка *Osmerus mordax dentex* Steindachner & Kner, 1870 (Новикова, 2007; Соколовский и др., 2009; Голубь и др., 2012). Микологические исследования этих видов до настоящего времени не проводились.

Цель данного исследования — изучить таксономический состав микобиоты дальневосточной наваги *E. gracilis* и азиатской корюшки *O. mordax dentex* в местах их обычных скоплений, а также традиционного любительского и промышленного лова в зал. Петра Великого Японского моря.

**Таблица 1.** Видовой состав и количество изолятов мицелиальных грибов, выделенных из органов дальневосточной наваги *Eleginus gracilis* (1) и азиатской корюшки *Osmerus mordax dentex* (2)

Вид	Кожа		Жабры		Мышцы		Печень		Гонада		Плавники	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
<i>Aspergillus flavus</i>	6/4	—	13/5	—	—	—	—	—	3/1	—	—	—
<i>As. wentii</i>	—	8/4	—	11/4	—	4/1	—	1/1	—	2/1	—	10/4
<i>Aspergillus</i> sp.	—	—	—	3/1	—	2/1	—	—	—	—	—	—
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	—	13/4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Humicola grisea</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	7/1
<i>Penicillium albidum</i>	—	9/3	—	1/1	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. brevicompactum</i>	—	—	7/3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. nigricans</i>	—	3/1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Phialophorophoma</i> sp.	—	—	2/2	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Всего изолятов	6	33	22	15	—	6	—	1	3	2	—	17

Примечание. Над чертой — количество изолятов грибов; под чертой — количество рыб; “—” — не обнаружен.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для микологических исследований служили по 10 особей дальневосточной наваги *Eleginus gracilis* и азиатской корюшки *Osmerus mordax dentex*, которые были выловлены в Амурском заливе в районе о-ва Скребцова (зал. Петра Великого Японского моря) методом подледного лова в январе 2013 г. Рыб помещали в стерильные пакеты и до камеральной обработки хранили при температуре  $-18^{\circ}\text{C}$  в морозильной камере. Затем рыб размораживали и препарировали. Препарированные органы (кожа, жабры, мышцы, печень, гонады, плавники) трехкратно промывали в стерильной морской воде и в течение 2 ч вымачивали в растворе антибиотиков (500 тыс. ед. пенициллина и 0.5 г стрептомицина на 1 л стерильной морской воды) (Артемчук, 1981) для подавления сопутствующей бактериальной флоры, затем промывали в стерильной морской воде для удаления антибиотиков.

Кусочки органов размером  $5 \times 5$  мм раскладывали на поверхность агаризованной питательной среды, по 5–7 фрагментов на чашку Петри для каждой особи рыб и каждого органа. Грибы, выросшие в смешанных культурах, пересеивали на свежую питательную среду для получения чистых культур.

Для выделения и культивирования грибов использовали универсальную среду Сабуро, приготовленную на профильтрованной и разбавленной (75%) морской воде, pH среды 7.5–7.8 (Литвинов, Дудка, 1975; Артемчук, 1981; Методы экспериментальной микологии, 1982). Перед разливом в чашки Петри в среду добавляли антибиотики пенициллин (500 тыс. ед./л) и стрептомицин (0.5 г/л), тщательно размешивая до полного растворения.

Для идентификации выделенных грибов использовали общепринятые ключи и определители (Ellis, 1971; Ramirez, 1982; Егорова, 1986; Билай, Коваль, 1988; Саттон и др., 2001; Klich, 2002). Современный таксономический статус мицелиальных грибов приведен в соответствии с Международной базой данных грибов Index Fungorum (<http://www.speciesfungorum.org>).

Штаммы мицелиальных грибов хранятся в коллекции микроорганизмов ЦКП Биоресурсного центра “Морской биобанк” Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (г. Владивосток).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При обследовании рыб в чистую культуру выделено 105 изолятов морских мицелиальных грибов: из дальневосточной наваги — 31 изолят, из азиатской корюшки — 74 изолята. В органах дальневосточной наваги обнаружено три вида мицелиальных грибов: *Aspergillus flavus* Link, *Penicillium brevicompactum* Dierckx и *Phialophorophoma* sp.; в органах азиатской корюшки — шесть видов: *Aspergillus wentii* Wehmer, *Aspergillus* sp., *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries, *Penicillium albidum* Sopp., *Penicillium nigricans* (Bain.) Thom и *Humicola grisea* Traaen (табл. 1). Все виды представляли анаморфные стадии сумчатых грибов.

Из 10 особей дальневосточной наваги без явных признаков патологии грибы обнаружены у шести рыб, у четырех рыб грибы не выявлены. По два вида грибов обнаружено у четырех особей наваги, по одному виду грибов — у двух особей. Изоляты *A. flavus* (22 изолята) составляли 71% от общего числа изолятов, *P. brevicompactum* (7 изолятов) — 22.6% и *Phialophorophoma* sp. (2 изолята) — 6.4%.

Из 10 особей азиатской корюшки без явных признаков патологии грибы обнаружены у шести рыб, у четырех рыб грибы не выявлены. По три вида грибов обнаружено у двух особей корюшки, по два вида грибов – у четырех рыб. Изоляты *A. wentii* (36) составляли 48.6% от общего числа изолятов, *Aspergillus* sp. (5) – 6.8%, *C. cladosporioides* (13) – 17.6%, *P. albidum* (10) – 13.5%, *P. nigricans* (3) – 4% и *H. grisea* (7) – 9.5%.

У дальневосточной наваги наибольшее количество видов грибов обнаружено в жабрах (три вида), в мышцах и печени обнаружено по два вида грибов, в кожных покровах и гонадах найден один вид (*A. flavus*) (табл. 1). Всего из кожных покровов наваги выделено 6 изолятов грибов (19.3% от общего числа изолятов), из жабр – 22 изолята (71%), из гонад – 3 (9.7%).

У азиатской корюшки распределение грибов было несколько иным. В кожных покровах обнаружено четыре вида грибов, в жабрах – три вида, в мышцах и на плавниках – по два вида, в печени и гонадах – по одному виду (табл. 1). Распределение изолятов грибов от их общего количества было следующим: из кожных покровов выделено 33 изолята грибов (44.6%), из жабр – 15 изолятов (20.3%), из мышц – 6 (8.1%), из печени – 1 изолят (1.3%), из гонад – 2 изолята (2.7%), из плавников – 17 изолятов (23%).

Соотношение количества изолятов каждого вида грибов к количеству зараженных ими особей дальневосточной наваги и азиатской корюшки по каждому органу варьировало (табл. 1).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Наши исследования показали, что в первую очередь мицелиальные грибы заселяют кожу и жабры. В желудочно-кишечный тракт споры грибов попадают с пищей. Кровь, циркулируя через заселенный грибами жаберный аппарат, разносит их по внутренним органам и тканям. Слизь рыб, обладая защитными антимикробными свойствами, препятствует развитию микроорганизмов (Ведемейер и др., 1981; Вихман, 1996). Этим можно объяснить различие в количестве обнаруженных видов грибов на коже азиатской корюшки и дальневосточной наваги, имеющей более обильный слизевой покров.

В результате микологического обследования дальневосточной наваги и азиатской корюшки не выявлено сходства комплексов мицелиальных грибов – ассоциантов данных видов рыб: не обнаружено ни одного общего вида грибов.

Обследованные нами рыбы не имели видимых патологий органов и тканей, однако в любом обществе большое число здоровых особей является потенциальным носителем различных заболеваний. Показано, что морские и речные гидро-

бионты повторяют микробное состояние своей среды обитания (Пивоваров и др., 1985; Liston, 1988, 1990; Ларцева, 1992; Ларцева, Катунин, 1993). При этом промысловые объекты прибрежного лова имеют большую бактериальную обсемененность, чем выловленные в море (Шульгина и др., 1995).

Выделенные нами из органов рыб мицелиальные грибы ранее были найдены в грунтах Амурского залива (Пивкин, 2010), в голотуриях (Pivkin, 2000) и во внутренних органах двустворчатого моллюска *Mizuhopecten yessoensis* (см.: Borzykh, Zvereva, 2014). Представители родов *Aspergillus*, *Cladosporium* и *Penicillium* являются обычными микромицетами на гидробионтах в морских и пресноводных водоемах; они обнаружены на осетровых в бассейне Каспийского моря (Ларцева, 1992; Воронина, 2010), на промысловых видах рыб в реках, озерах и водохранилищах России (Воронин, 1986), а также на икре лососевых в рыбобитомнике “Пуща-Водица” (Украина) (Исаева и др., 1995).

Грибы родов *Aspergillus*, *Cladosporium* и *Penicillium* относятся к группе потенциально патогенных (оппортунистических) и токсинообразующих грибов, способных вызывать микозы и микотоксикозы гидробионтов из морских и пресноводных местообитаний (Исаева и др., 1995; Головина и др., 2003). Грибы, принадлежащие к роду *Cladosporium*, изолировали из гиперплазированного эпителия жабр трески *Gadus mohrua*, анаморфный грибок *Hormoconis* (*Cladosporium*) *resinae* вызывал изъязвление тканей камбалы *Hippoglossoides platessoides* (см.: Strongman et al., 1997). При микологическом обследовании анчоусовидной тюльки *Clupeonella engrauliformis* из Каспийского моря, имевшей злокачественные опухолевые (грануломатозные) образования печени, селезенки и семенников, были выявлены грибы родов *Aspergillus* и *Alternaria* (см.: Воронина, 2010). Анаморфные грибы *Penicillium corylophilum* и *Cladosporium sphaerospermum* являлись возбудителями микозов у красного окуня *Lutjanus campechanus* (см.: Blaylock et al., 2001). Наибольшую опасность в пищевых продуктах представляют аспергилловые грибы, образующие афлатоксины (Голова, Дедюхина, 1986).

Грибы рода *Aspergillus* являются продуцентами микотоксинов: афлатоксинов (*A. flavus*, *A. parasiticus* и др.), охратоксинов (*A. ochraceus*), стеригматоцистинов (*A. versicolor*, *A. nidulans*) и глиотоксинов (*A. fumigatus*); они способны вызывать микотоксикозы у человека, а также у водных и наземных животных. Известно, что афлатоксины обладают канцерогенным действием (Билай, Коваль, 1988). *A. flavus*, выделенный из двустворчатого моллюска *M. yessoensis*, обитающего в Амурском заливе, продуцировал афлатоксины, которые накаплива-

лись в его внутренних органах (Зверева и др., 2009). Микотоксины *A. flavus* и *A. parasiticus* вызывают афлатоксикоз у культивируемых ракообразных, который приводит к некрозу пищеварительной железы (Sindermann, Lightner, 1988).

Таким образом, в результате проведенного микологического обследования дальневосточной наваги *Eleginus gracilis* и азиатской корюшки (зубатки) *Osmerus mordax dentex* установлен таксономический состав мицелиальных грибов. Показано, что основными местами локализации грибов являются кожные покровы и жабры рыб.

### 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

Исследования морских мицелиальных грибов поддержаны грантом ДВО РАН "Дальний Восток" № 18-4-050.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Артемух Н.Я. Микофлора морей СССР. М.: Наука. 1981. 192 с.
- Билай В.И., Коваль Э.З. Аспергиллы. Киев: Наукова думка. 1988. 204 с.
- Ведемейер Г.А., Мейер Ф.П., Смит Л. Стресс и болезни рыб. М.: Легкая пром-сть. 1981. 127 с.
- Вихман А.А. Системный анализ иммунофизиологической реактивности рыб в условиях аквакультуры. М.: Экспедитор. 1996. 174 с.
- Воронин Л.В. Грибы, развивающиеся на лещах и судаках некоторых пресных водоемов // Микология и фитопатология. 1986. Т. 20. Вып. 5. С. 353–361.
- Воронина Е.А. Микозное заболевание анчоусовидной тюльки (*Clupeonella engrauliformis*, Borodin) в Каспийском море // Вестн. Астрахан. гос. техн. ун-та. Сер.: Рыб. хоз-во. 2010. № 2. С. 10–13.
- Голова Ж.А., Дедюхина В.П. Микробиология рыбы и рыбных продуктов. М.: Агропромиздат. 1986. 148 с.
- Головина Н.А., Стрелков Ю.А., Воронин В.Н. и др. Ихтиопатология. М.: Мир. 2003. 448 с.
- Голубь Е.В., Батанов Р.Л., Голубь А.П. Материалы по биологии азиатской корюшки *Osmerus mordax Dentex* (Osmeridae) из водоемов Чукотки // Вестн. Северо-Восточ. науч. центра ДВО РАН. 2012. № 2. С. 50–62.
- Егорова Л.Н. Почвенные грибы Дальнего Востока. Гифомицеты. Л.: Наука. 1986. 191 с.
- Зверева Л.В., Стоник И.В., Орлова Т.Ю., Чикаловец И.В. Миколого-токсикологические исследования двусторчатых моллюсков // Бюл. Моск. о-ва испыт. природы. Отд. биол. 2009. Т. 114. № 3 S1. С. 322–324.
- Исаева Н.М., Давыдов О.Н., Дудка И.А., Неборачек И.С. Микозы и микотоксикозы рыб. Киев: Институт зоологии НАН Украины. 1995. 168 с.
- Ларцева Л.В. Микобиота осетровых рыб Волго-Каспийского бассейна // Микология и фитопатология. 1992. Т. 26. Вып. 1. С. 23–26.
- Ларцева Л.В., Катунин Д.Н. Микрофлора рыб – биоиндикатор загрязнения дельты Волги // Вод. биоресурсы, воспроизводство и экология. 1993. Т. 69. С. 7–27.
- Литвинов М.А., Дудка И.А. Методы исследования микроскопических грибов пресных и соленых (морских) водоемов. Л.: Наука. 1975. 151 с.
- Методы экспериментальной микологии. Справочник / Под ред. В.И. Билай. Киев: Наукова думка. 1982. 550 с.
- Новикова О.В. Дальневосточная навага *Eleginus gracilis* (Til.) прикамчатских вод: Дис. ... канд. биол. наук. 29.05.2007. Петропавловск-Камчатский: Камчат. гос. техн. ун-т. 2007. 161 с.
- Пивкин М.В. Вторичные морские грибы Японского и Охотского морей: Дис. ... д-ра биол. наук. М.: МГУ. 2010. 407 с.
- Пивоваров Ю.П., Подъяснев С.В. Аэробная микрофлора свежельвленной и мороженой промысловой рыбы // Гигиена и санитария. 1985. № 6. С. 80–81.
- Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. Определитель патогенных и условно-патогенных грибов. М.: Мир. 2001. 486 с.
- Соколовский А.С., Соколовская Т.Г., Яковлев Ю.М. Рыбы залива Петра Великого. Владивосток: Дальнаука. 2009. 375 с.
- Шульгина Л.В., Загородная Г.И., Шульгин Ю.П. и др. Микрофлора дальневосточных морей и ее влияние на продукцию из промысловых объектов // Гигиена и санитария. 1995. № 1. С. 14–16.
- Borzykh O.G., Zvereva L.V. Comparison of Fungal Complexes of Japanese Scallop *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1856) from Different Areas in the Peter the Great Bay of the Sea of Japan // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. № 5. P. 684–689.
- Blaylock R.B., Overstreet R.M., Klich M.A. Mycoses in red snapper (*Lutjanus campechanus*) caused by two deuteromycete fungi (*Penicillium corylophilum* and *Cladosporium sphaerospermum*) // Hydrobiologia. 2001. V. 460. P. 221–228.
- Ellis M.B. Dematiaceae Hyphomycetes, England, Surrey: CMI. 1971. 608 p. *Index Fungorum*: <http://www.speciesfungorum.org>
- Klich M.A. Identification of Common *Aspergillus* species. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmeldaturs, 2002. 116 p.
- Liston J. Microorganisms as a cause of economic loss to the seafood industry // Oceans'88; Proc; Baltimore, Oct. 31. 1988. № 1. P. 52–55.
- Liston J. Microbial hazards of seafood consumption // Food Technol. 1990. V. 44. № 12. P. 58–62.

- Neish G.A., Hughes G.C.* Fungal diseases of Fishes // Eds. S.F. Snieszko, H.R. Axelrod. Diseases of Fishes. Book 6. T.F.H. Publ. Inc. Ltd. 1980. 159 p.
- Noga E.J.* A synopsis of mycotic diseases of marine fishes and invertebrates // Pathology in Mar. Sci. New York: Academic Press. 1990. P. 143–160.
- Pivkin M.V.* Filamentous fungi associated with holothurians from the Sea of Japan, off the Primorye coast of Russia // Biol. Bull. 2000. V. 198. P. 101–109.
- Ramirez C.* Manual and Atlas of the Penicillia // New York–Amsterdam: Elsevier Biomedical Press. 1982. 874 p.
- Sindermann C.J., Lightner D.V.* Diseases Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 1988. 431 p.
- Strongman D.B., Morrison C.M., McClelland G.* Lesions in the musculature of captive American plaice *Hippoglossoides platessoides* caused by the fungus *Hormoconis resiniae* (Deuteromycetes) // Dis. Aquat. Org. 1997. V. 28. P. 107–113.

## **Mycobiota of the Saffron Cod *Eleginus gracilis* (Tilesius, 1810) and the Asiatic Smelt *Osmerus mordax dentex* Steindachner & Kner, 1870 in Peter the Great Bay of the Sea of Japan**

**L. V. Zvereva<sup>a</sup> and O. G. Borzykh<sup>a</sup>**

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

A mycological examination of the Saffron cod *Eleginus gracilis* (Tilesius, 1810) and the Asiatic smelt *Osmerus mordax dentex* Steindachner & Kner, 1870, caught in the Amursky Bay (Peter the Great Bay of the Sea of Japan) revealed several species of filamentous fungi. In total, 105 isolates of filamentous fungi were obtained from the skin integument and internal organs (31 isolates from the Saffron cod and 74 isolates from the Asiatic smelt). Three species of filamentous fungi were found in the Saffron cod: *Aspergillus flavus* Link, *Penicillium brevicompactum* Dierckx, and *Phialophorophoma* sp. Six species of filamentous fungi were found in the Asiatic smelt: *Aspergillus wentii* Wehmer, *Aspergillus* sp., *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries, *Penicillium albidum* Sopp., *Penicillium nigricans* (Bain.) Thom, and *Humicola grisea* Traaen. All the species identified represent anamorphic stages of ascomycetes. In the Saffron cod, the organs, most frequently involved by fungi, were gills (three fungus species found), two species of fungi were found in muscles and liver; and one species in each was identified in the skin integument and in gonads. Distribution of fungi in the Asiatic smelt was different: four fungus species were revealed in the skin integument, three species in the gills, two species in muscles, one species in the liver, one species in the gonads, and two species – on the fins.

**Keywords:** marine filamentous fungi, the Saffron cod *Eleginus gracilis*, the Asiatic smelt *Osmerus mordax dentex*, Peter the Great Bay, Sea of Japan

УДК 595.36

## МОРФОЛОГИЯ МАНДИБУЛ ЛИЧИНОК И ВЗРОСЛЫХ РОЮЩИХ КРЕВЕТОК *BOASAXIUS PRINCEPS* И *LEONARDSAXIUS AMURENSIS* (DECAPODA: AXIIDAE: AXIIDAE)

© 2020 г. Е. С. Корниенко<sup>1</sup>, \*, Д. Д. Голубинская<sup>1</sup>

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

\*e-mail: kornielena@mail.ru

Поступила в редакцию 09.09.2019 г.

После доработки 09.12.2019 г.

Принята к публикации 19.03.2020 г.

Представлено описание морфологии мандибул роющих креветок *Boasaxius princeps* (Boas, 1880) и *Leonardsaxius amurensis* (Kobjakova, 1937) на разных этапах онтогенеза. Резцовый отросток мандибул зоэа аксиид уплощен в передне-заднем направлении, несет 3 терминальных зуба; молярный отросток широкий, жевательная поверхность образована поперечными кутикулярными гребнями и имеет кайму из кистевидных выростов на переднем крае левой мандибулы, а также на заднем крае правой; между терминальной частью резцового отростка и молярным отростком расположен ряд шипов. Основной план строения мандибул сохраняется на всех стадиях зоэа, по мере развития личинок увеличивается количество поперечных гребней на молярном отростке и групп в ряду шипов. На стадии мегалопы форма мандибул изменяется: резцовый отросток становится широким и вогнутым, молярный отросток располагается перпендикулярно к нему; шипы и гребни на жевательной поверхности молярного отростка редуцируются, на резцовом отростке сохраняются мелкие шипы на режущем крае. У взрослых особей кутикулярные образования на жевательной поверхности отсутствуют. Несмотря на заметные различия в морфологии мандибул взрослых особей, отмечено сходство мандибул зоэа Аxiidae и некоторых каридных креветок.

**Ключевые слова:** Аxiidae, зоэа, мегалопа, морфология мандибул, гнатальная доля

**DOI:** 10.31857/S013434752004004X

Мандибулы – ротовые придатки, участвующие в первичной обработке пищи и выполняющие механическую и сенсорную функции. У десятиногих ракообразных они расположены между лабрумом и максиллулой, состоят из латеральной, гнатальной долей и мандибулярной пальпы; наличие последней не является обязательным. Гнатальная доля представлена резцовым и молярным отростками, степень развития которых может значительно варьировать до полного отсутствия одного из них (Felgenhauer, Abele, 1985; Буруковский, 2009; Tudge et al., 2012; Ashelby et al., 2015, и др.). Морфология мандибул взрослых декапод детально описана у некоторых видов Caridea (Felgenhauer, Abele, 1985; Storch et al., 2001; Ashelby et al., 2015), Brachyura (Factor, 1982; Carvalho et al., 2017), Anomura (Garm, Høeg, 2000; Garm, 2004a; Jaszko-wiak et al., 2015), Astacidea и Achelata (Sahlmann et al., 2011), Gebiidea и Axiidea (Nickell et al., 1998; Pinn et al., 1999).

Бентосные десятиногие ракообразные в онтогенезе проходят несколько пелагических стадий

зоэа и стадию мегалопы, на которой происходит оседание. При светооптических исследованиях небольшие размеры и сложная трехмерная конфигурация мандибул личинок декапод не позволяют выявить отдельные детали их строения. Описания мандибулы зоэа I, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ), известны для нескольких видов Brachyura (Greenwood, Fielder, 1979; Factor, 1982; Minagawa, Takashima, 1994; Meyer et al., 2006; Lumasag et al., 2007), Anomura (Geiselbrecht, Melzer, 2010), Caridea (Geiselbrecht, Melzer, 2010; Tziouveli et al., 2011; Batel et al., 2014), Astacidea и Achelata (Factor, 1978; Wolfe, Felgenhauer, 1991; Lavalli, Factor, 1992; Johnston et al., 2008). У краба *Menippe mercenaria* (Brachyura) описана морфология мандибул нескольких стадий зоэа, мегалопы, ювенильной и взрослой особей (Factor, 1982). Результаты изучения мандибул зоэа и мегалопы приведены в работе посвященной исследованию развития пищеварительной системы у краба *Scylla serrata* (Brachyura, Portunidae) (см.: Lumasag et al., 2007). Среди Caridea мандибулы описаны у зоэа I–V двух видов креветок-пале-

монид (Batel et al., 2014), у первой и последней стадий зоэа креветки *Lysmata amboinensis* (Lysmatidae) (см.: Tziouveli et al., 2011). В той или иной степени изучена морфология мандибул на разных стадиях развития Achelata (Wolfe, Felgenhauer, 1991; Johnston, Ritar, 2001) и Astacidea (Factor, 1978; Lavalli, Factor, 1992).

Данные о морфологии мандибул востребованы в таксономии ракообразных и в филогенетических построениях, хотя существует мнение, что форма мандибулы взрослой особи дает представление в первую очередь о рационе и способе питания вида. В тоже время на ранних этапах развития декапод отмечено значительное сходство морфологии мандибул у близкородственных видов, а различия, обнаруженные с помощью СЭМ, служат ценными видоспецифическими или диагностическими признаками (Geiselbrecht, Melzer, 2010).

Инфраотряды Axiidea и Gebiidea выделены относительно недавно на основании молекулярно-генетических исследований (Bracken et al., 2009; Robles et al., 2009, и др.). В настоящее время этой классификации придерживается большинство карцинологов (Poore et al., 2014). Однако положение Gebiidea и Axiidea среди Reptantia остается плохо разрешенным (Lin et al., 2012) и дополнительная информация, в том числе о морфологии личинок этих групп, может оказаться полезной применительно к филогении.

Роющие креветки инфраотрядов Axiidea и Gebiidea по способу питания относятся к грунтоедом, фильтраторам или падальщикам, но в зависимости от доступности пищи могут изменять пищевые предпочтения (Griffis, Suchanek, 1991; Nickell, Atkinson, 1995; Nickell et al., 1998; Pinn et al., 1999). Общий план строения мандибул взрослых Gebiidea и Axiidea совпадает, незначительные различия касаются количества зубцов на резцовом отростке и вооружения пальпы (Nickell et al., 1998; Stamhuis et al., 1998; Pinn et al., 1999). Однако исследование мандибул зоэа I трех видов *Upogebia* (Gebiidea: Upogebiidae) и двух видов *Nihonotrypaea* (Axiidea: Callianassidae) показало, что у них заметно различаются не только вооружение резцового и молярного отростков, но и общая форма мандибул, которая у первых ближе к таковой у Anomura, а у вторых — к Caridea (Корниенко, Голубинская, 2018). Семейство Axiidae, к которому относятся *Boasaxius princeps* и *Leonardsaxius amurensis*, считается наиболее древней группой Axiidea (Lin et al., 2012; Hužný, Klompmaker, 2015). Сравнительный анализ морфологии мандибул зоэа у этих видов и у изученных ранее представителей семейства Callianassidae (Корниенко, Голубинская, 2018) позволит выявить различия на уровне родов и семейств.

Цель настоящего исследования — описание морфологии гнатальной части мандибул у двух представителей семейства Axiidae на разных этапах онтогенеза и оценка полученных данных с точки зрения применения в филогенетических построениях.

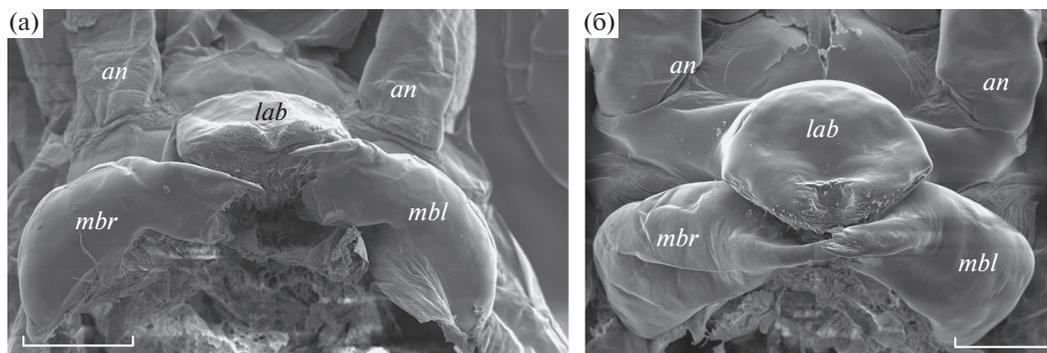
## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Зоэа I роющих креветок *Boasaxius princeps* и *Leonardsaxius amurensis* семейства Axiidae выделены из планктонных проб, взятых в районе биостанции “Восток” ННЦМБ ДВО РАН (зал. Восток, Японское море) в июле 2017 и 2018 гг. Отловленных здесь же взрослых креветок (по одной особи каждого вида) фиксировали и хранили в 70% этаноле. Зоэа I *B. princeps* и *L. amurensis* идентифицировали до вида с помощью определительного ключа, основанного на морфологических признаках (Корн и др., 2017). Личинок фиксировали по предложенной ранее методике (Meyer, Melzer, 2004) и хранили в 70% этаноле. У 20–25 экз. зоэа I каждого вида извлекали отдельно левую и правую мандибулы. Для описания морфологии мандибул на старших стадиях развития использовали личинок, выращенных ранее в лабораторных условиях и фиксированных 4% раствором формальдегида на морской воде (Kornienko et al., 2014, 2018). Для анализа выбраны стадии зоэа, на которых мандибулы уже имели хорошо заметную почку пальпы (*L. amurensis* — зоэа III, *B. princeps* — зоэа V), и заключительные стадии зоэа (*L. amurensis* — зоэа V, *B. princeps* — зоэа VIII). Препарировали по 5–6 зоэа каждой стадии и по 3 мегалопы каждого вида; левую и правую мандибулы извлекали отдельно.

Мандибулы зоэа I и взрослых особей обезвоживали в серии этанола (70, 90, две смены 95% — по 10 мин в каждой) и ацетона (этанол : ацетон — 3 : 1, 1 : 1, 1 : 3, две смены ацетона по 10 мин в каждой). Фиксированные в формальдегиде образцы зоэа старших стадий и мегалоп отмывали в двух порциях дистиллированной воды и обезвоживали в серии этанола (15, 30, 50, 70%). Затем мандибулы препарировали и окончательно обезвоживали, как описано выше. К сожалению, фиксированные в формальдегиде мандибулы мегалоп *L. amurensis* стали очень хрупкими и были утрачены в процессе обработки.

Высушенные в двуокиси углерода до критической точки образцы монтировали на SEM-столики с самоклеящимися углеродными наклейками, мандибулы личинок напыляли хромом, мандибулы взрослых особей — золотом. Фотографии делали на СЭМ Zeiss Sigma 300VP в Дальневосточном центре электронной микроскопии ННЦМБ ДВО РАН.

Для обозначения выростов кутикулы с крепким основанием и несколькими зубцами на вершине, расположенных по краям жевательной по-



**Рис. 1.** Вентральный вид препарированных зоэ I *Boasaxius princeps* (а) и *Leonardsaxius amurensis* (б). Обозначения: *an* – антенна, *lab* – лабрум, *mbl* – левая мандибула, *mbr* – правая мандибула. Масштаб: 100 мкм.

верхности молярного отростка мандибул зоэ, использовали термин “кистевидные выросты”. В литературе эти образования известны как прочные шипы с маленькими зубчиками на дистальном конце (stout spines with small denticles on its distal end, см.: Richter et al., 2002), кистевидные выросты (brush-like protrusions, см.: Tziouveli et al., 2011) или пальцевидные отростки (finger-like projections, см.: Ashelby et al., 2015). Расположенные на боковой поверхности мандибул мелкие кутикулярные выросты, похожие на щетинки, мы называем зубчиками (denticles), так как у их основания нет базального кольца (Garm, 2004b). Строну мандибул, обращенную к лабруму, указываем как внешнюю (вид спереди), противоположную ей – как внутреннюю (вид сзади). При описании гнатальной части мандибул старших стадий зоэ отмечали только изменения в морфологии (Clark et al., 1998). Видовые названия приведены в соответствии с последними переописаниями (Sakai, 2011, 2017; Marin, 2015).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Мандибулы зоэ роющих креветок

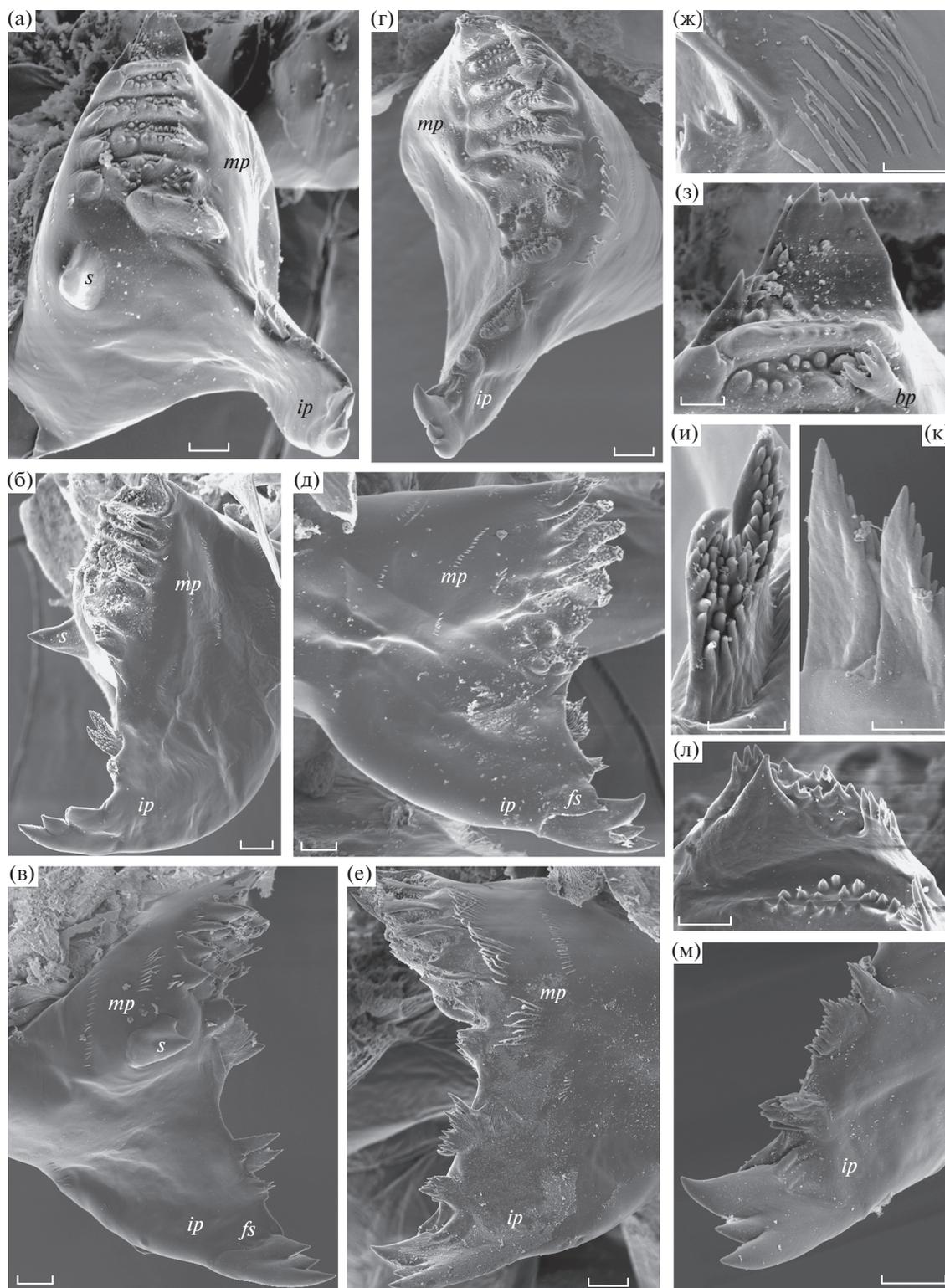
Основная форма мандибул зоэ *Boasaxius princeps* и *Leonardsaxius amurensis* (рис. 1) – толстая изогнутая овальная трубка. Молярный и резцовый отростки хорошо отделены друг от друга. В дистальной части форма поперечного сечения мандибулы в виде запятой. Резцовый отросток расположен вентрально, заметно уплощен в передне-заднем направлении и вооружен тремя мощными терминальными зубами разного размера. На левой мандибуле резцовый отросток сдвинут к ее внешней боковой поверхности, на правой мандибуле – к внутренней. На левой мандибуле к основанию одного из терминальных зубов резцового отростка с внутренней стороны плотно прилегает плоский шип; на правой мандибуле этот шип расположен с внешней стороны. Широкий молярный отросток находится дорсальнее резца.

В молярной части левой мандибулы с внутренней стороны хорошо виден расположенный за пределами жевательной поверхности крупный гладкий шип, который отсутствует на правой мандибуле. Форма жевательной поверхности левой мандибулы близка к треугольной, правой – к овальной. На дорсальной и латеральных поверхностях молярного отростка расположены группы плоских зубчиков длиной от 2 до 8 мкм (рис. 2ж). На резцовом отростке между его терминальной частью и молярным отростком находится ряд шипов (далее – промежуточный ряд), состоящий из нескольких групп шипов. У зоэ I мандибулярная пальпа отсутствует, у старших стадий несегментированная пальпа расположена дорсолатерально на внешней стороне молярного отростка.

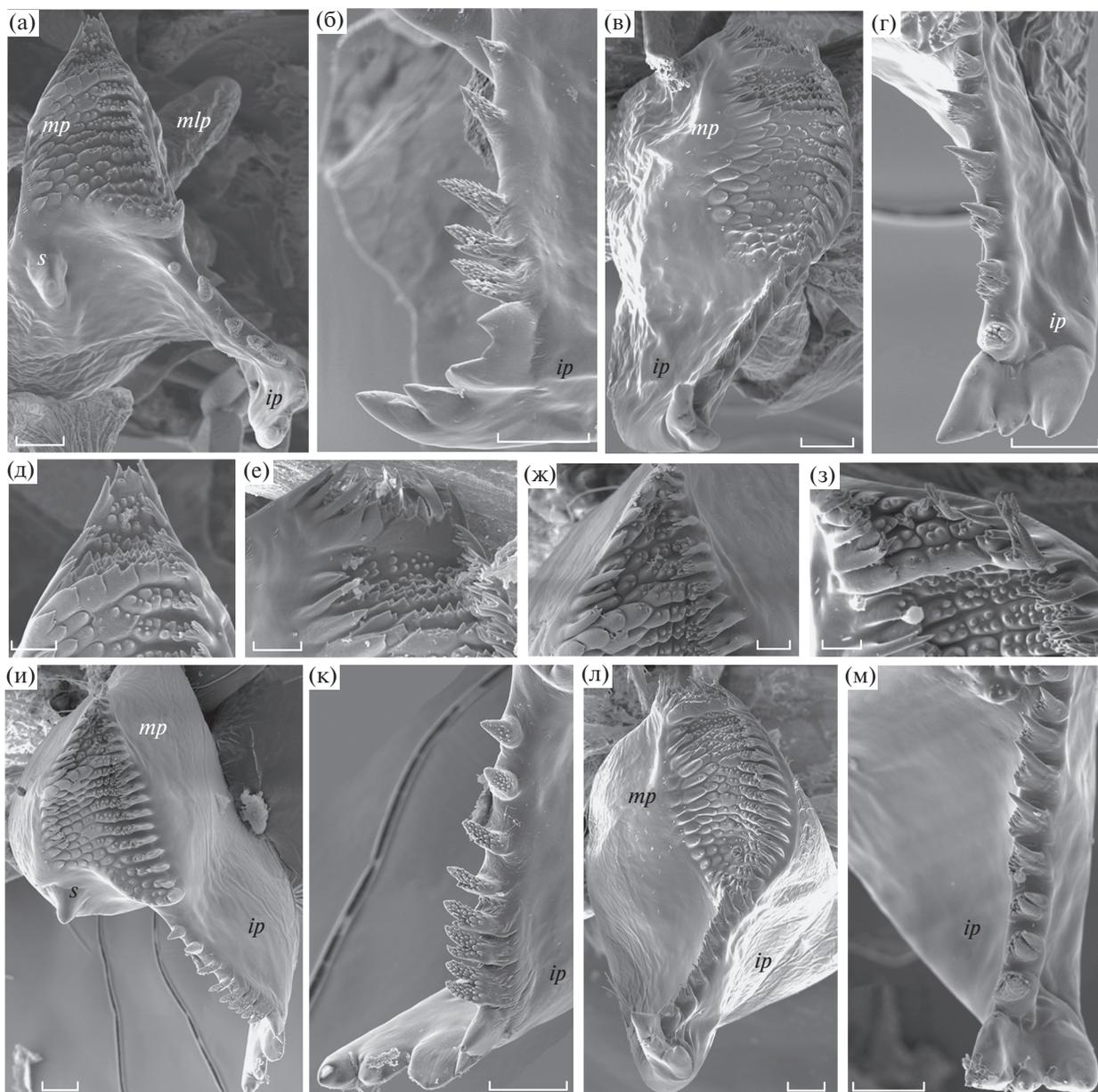
### *Boasaxius princeps* (рис. 2, 3)

#### Зоэ I (рис. 2)

**Левая мандибула** (рис. 2а–2в, 2з–2к). Дорсальная часть молярного отростка узкая, немного приподнята и несет несколько небольших шипов, отделена от жевательной поверхности заметным гребнем с мелкими шипами на вершине (рис. 2з). В вентральной части молярного отростка жевательную поверхность ограничивает гребень с одним рядом мелких шипов на вершине. Рельеф центральной части образован четырьмя поперечными гребнями, на их вершинах два ряда мелких шипов. На внешнем крае жевательной поверхности 3 гребня начинаются с кистевидных выростов. Похожим выростом гребни могут заканчиваться и на внутреннем крае. Промежуточный ряд состоит из двух групп шипов (рис. 2в). Первая группа – мелкие шипы, основания которых сливаются, высота этого образования около 4 мкм; вторая группа – два уплощенных шипа длиной около 10 мкм, их поверхность с внутренней стороны гладкая, а с внешней стороны покрыта небольшими зубчиками (рис. 2и, 2к). Наиболее крупные поры находятся между гребнями молярного отростка, на основании первой группы ши-



**Рис. 2.** Морфология левой (а–в, з–к) и правой (г–е, л, м) мандибул зоэа I *Boasaxius princeps* и кутикулярные выросты на боковой поверхности мандибул (ж). а, г – вид со стороны жевательной поверхности; б, д – вид спереди; в, е – вид сзади; з, л – дорсальная часть молярного отростка; и, к, м – ряд шипов между резцовым и молярным отростками мандибул (и – вид шипов с внешней, к – с внутренней стороны). Обозначения здесь и далее: *bp* – кистевидный вырост; *fs* – плоский шип; *ip* – резцовый отросток; *mp* – молярный отросток; *s* – шип за пределами жевательной поверхности молярного отростка. Масштаб: а–е, м – 10 мкм; ж–л – 4 мкм.



**Рис. 3.** Морфология мандибул зоза V (а–е) и зоза VIII (ж–м) *Boasaxius princeps*. а, в, и, л – вид со стороны жевательной поверхности (здесь и далее *mlp* – мандибулярная пальпа); б, г, к, м – ряд шипов между резцовым и молярным отростками мандибул; д–з – дорсальная часть молярного отростка. Масштаб: а–г, и–м – 20 мкм; д–з – 10 мкм.

пов и на одном из терминальных шипов резцового отростка.

**Правая мандибула** (рис. 2г–2е, 2л, 2м). Дорсальная часть молярного отростка немного приподнята и состоит из двух лопастей, вооруженных небольшими шипами (рис. 2л). Рельеф жевательной поверхности в нижней части образован группами мелких шипов, имеющих общее основание. В центральной части жевательной поверхности расположены 5 поперечных гребней с рядами мелких шипов на вершине. Высота гребней увеличивается от внешнего к внутреннему краю же-

вательной поверхности. Четыре гребня на внутреннем крае заканчиваются кистевидными выростами. Гребень, отделяющий дорсальную часть молярного отростка, такого выроста не имеет. Промежуточный ряд состоит из двух групп шипов, основания которых сливаются (рис. 2м). У первой группы шипов общее основание округлое, у второй группы оно вытянуто вдоль оси; внутренняя сторона шипов гладкая, внешняя сторона покрыта мелкими зубчиками. На поверхности резцового и молярного отростков отмече-

ны поры, наиболее крупные находятся между гребнями жевательной поверхности.

#### Зоэа V (рис. 3а–3е)

**Левая мандибула** (рис. 3а, 3б, 3д). На внутреннем и внешнем краях дорсальной части молярного отростка расположено по 2–3 кистевидных выроста. Один кистевидный вырост виден на внешнем крае гребня, отделяющего дорсальную часть от жевательной поверхности (рис. 3д). У внутреннего края жевательной поверхности располагаются отдельные шипы с заостренными вершинами. От середины жевательной поверхности начинаются 7–8 поперечных гребней, которые состоят из отдельных шипов с 2–4 острыми вершинами и заканчиваются на внешнем крае двумя кистевидными выростами. Промежуточный ряд из пяти групп шипов (рис. 3б).

**Правая мандибула** (рис. 3в, 3г, 3е). На внутреннем и внешнем краях приподнятой дорсальной части молярного отростка по 2–3 кистевидных выроста (рис. 3е). Рельеф жевательной поверхности образуют 11–12 поперечных гребней, которые прослеживаются от центральной части до внутреннего края и заканчиваются двумя кистевидными выростами. Остальная поверхность покрыта небольшими шипами с 1–4 заостренными вершинами. Промежуточный ряд из шести групп шипов (рис. 3г).

#### Зоэа VIII (рис. 3ж–3м)

**Левая мандибула** (рис. 3ж, 3и, 3к). На внешнем крае дорсальной части молярного отростка расположено 3–4 кистевидных выроста (рис. 3ж). На жевательной поверхности 8–9 гребней с 2–3 кистевидными выростами у внешнего края. Промежуточный ряд из семи групп шипов (рис. 3к).

**Правая мандибула** (рис. 3з, 3л, 3м). На внутреннем и внешнем краях приподнятой дорсальной части молярного отростка по 3–4 кистевидных выроста (рис. 3з). Рельеф жевательной поверхности молярного отростка образован 12–14 гребнями с кистевидными выростами. Количество групп шипов в промежуточном ряду увеличивается до восьми (рис. 3м).

#### *Leonardsaxius amurensis* (рис. 4, 5)

##### Зоэа I (рис. 4)

**Левая мандибула** (рис. 4а–4в, 4ж–4и). Дорсальная часть молярного отростка узкая, заметно приподнятая, гладкая; у ее основания многочисленные мелкие шипики; от жевательной поверхности отделена небольшим гребнем (рис. 4ж). Жевательную поверхность с внутренней стороны окаймляют 5–6 плоских шипов; рельеф в центральной части представлен расположенными в виде чешуек уплощенными шипами с одной или несколькими заостренными вершинами. По направлению к внешнему краю шипы объединяются в 6–8 рядов, которые заканчиваются кистевид-

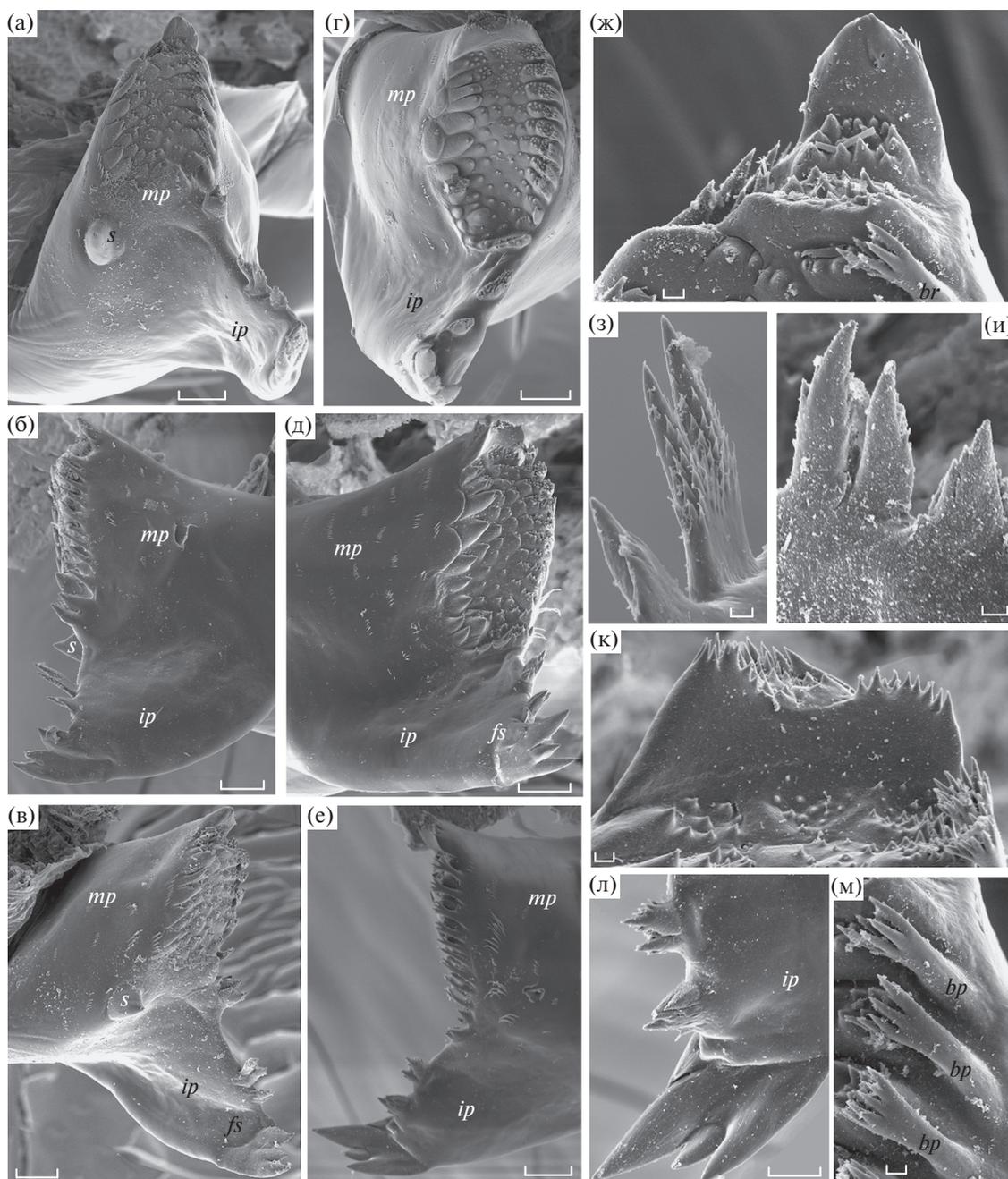
ными выростами. Промежуточный ряд из двух групп шипов (рис. 4з, 4и, 4л). В первой группе шипы сливаются, образуя единый вырост длиной 7–9 мм с несколькими вершинами. Вторая группа состоит из двух уплощенных шипов длиной около 18 мкм. С внутренней стороны шипы гладкие, а с внешней стороны покрыты небольшими зубчиками. На поверхности молярного и резцового отростков видны поры, наиболее крупные находятся в дорсальной части молярного отростка, между гребнями жевательной поверхности и на одном из терминальных шипов резца.

**Правая мандибула** (рис. 4г–4е, 4к–4м). Дорсальная часть молярного отростка широкая, немного приподнята; состоит из двух лопастей, вооруженных небольшими шипами (рис. 4к). Жевательная поверхность овальной формы, в нижней части ее ограничивает гребень с мелкими шипами на вершине, центральная часть покрыта шипами с одной или несколькими вершинами. Вдоль внутреннего края жевательной поверхности шипы образуют 9–11 коротких поперечных рядов, которые завершаются кистевидными выростами (рис. 4м). Промежуточный ряд состоит из двух групп шипов (рис. 4л). Собранные компактно шипы первой группы имеют общее основание округлой формы. У второй группы шипов общее основание вытянутое; внутренняя сторона шипов гладкая, а внешняя покрыта мелкими зубчиками. На поверхности резцового и молярного отростков видны поры, наиболее крупные находятся между гребнями и в дорсальной части жевательной поверхности.

##### Зоэа III (рис. 5а–5е)

**Левая мандибула** (рис. 5а, 5б, 5д). Дорсальная часть молярного отростка представляет собой узкий выступ, отделенный от жевательной поверхности небольшим плато с мелкими шипами и гребнем; несколько кистевидных выростов наиболее отчетливо видны на внешнем крае. Рельеф жевательной поверхности образован 8–9 гребнями с мелкими шипами на вершинах. Каждый гребень начинается на внешнем крае двумя кистевидными выростами и заканчивается примерно посередине поверхности. У внутреннего края расположены уплощенные шипы в виде чешуек. Вентральной границей жевательной поверхности служит заметный гребень с рядом шипов на вершине. Количество групп шипов в промежуточном ряду увеличивается до четырех (рис. 5б).

**Правая мандибула** (рис. 5в, 5г, 5е). Дорсальная часть молярного отростка широкая, приподнятая, покрыта небольшими шипами; на внутреннем и внешнем краях расположено по 2 кистевидных выроста (рис. 5е). От внешнего края к центру жевательная поверхность покрыта небольшими шипами с 1–4 заостренными вершинами. От центра поверхности начинаются 12–13 поперечных



**Рис. 4.** Морфология левой (а–в, ж–и) и правой (г–е, к–м) мандибул зоэа I *Leonardosaxius amurensis*. а, г – вид со стороны жевательной поверхности; б, д – вид спереди; в, е – вид сзади; ж, к – дорсальная часть молярного отростка; з, и, л – ряд шипов между резцовым и молярным отростками мандибул (з – вид шипов с внешней, и – с внутренней стороны); м – край жевательной поверхности с кистевидными выростами. Масштаб: а–е – 20 мкм; ж–и, м – 4 мкм; л – 10 мкм.

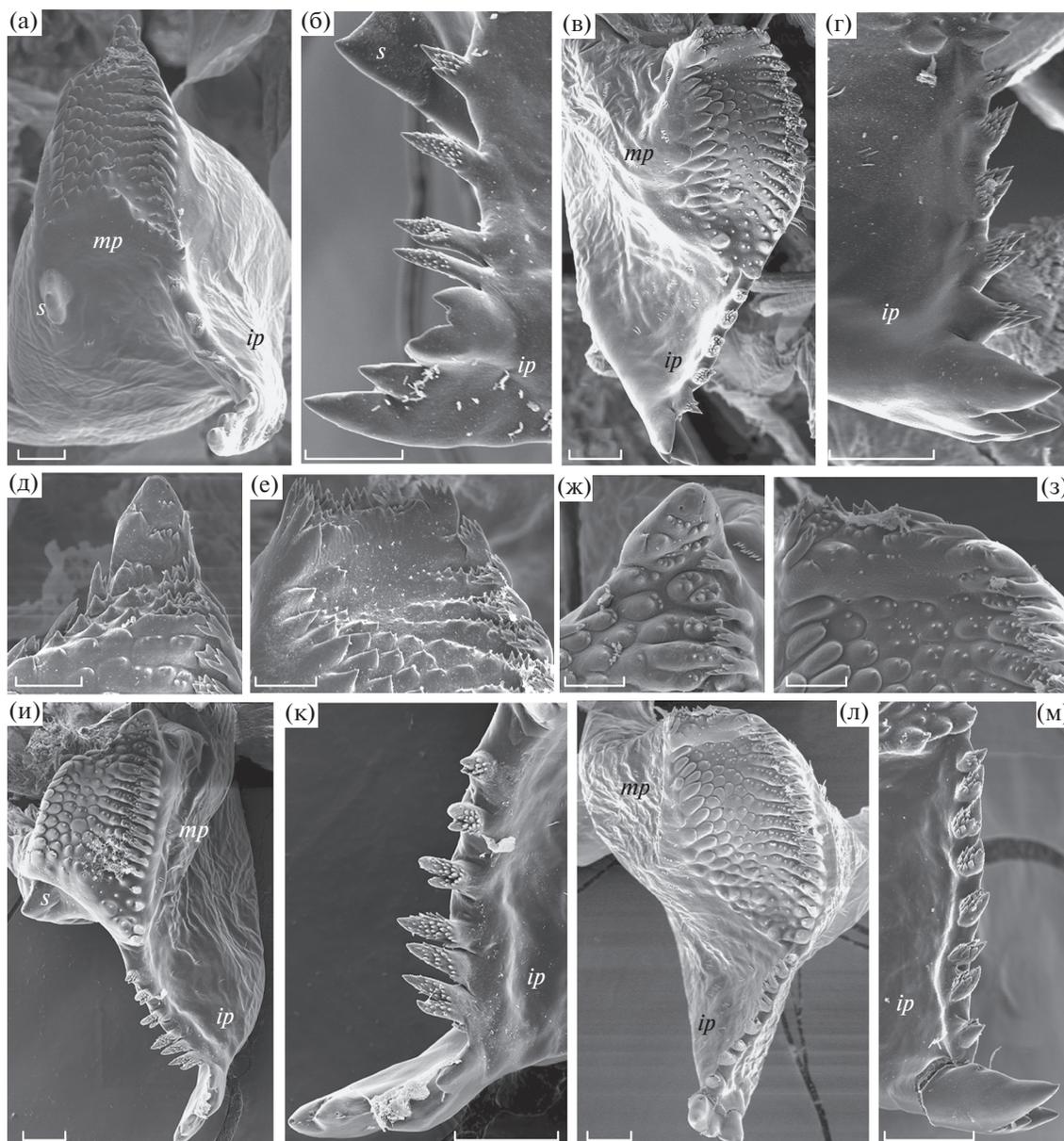
гребней с мелкими шипами на вершинах. На внутреннем крае гребни заканчиваются 1–2 кистевидными выростами. Промежуточный ряд из пяти групп шипов (рис. 5г).

Зоэа V (рис. 5ж–5м)

**Левая мандибула** (рис. 5ж, 5и, 5к). Количество поперечных гребней с кистевидными выростами у внешнего края жевательной поверхности увели-

чивается до 11–12. Промежуточный ряд из шести групп шипов (рис. 5к).

**Правая мандибула** (рис. 5з, 5л, 5м). Рельеф жевательной поверхности молярного отростка образован 12–13 гребнями с кистевидными выростами. Количество групп шипов в промежуточном ряду увеличивается до восьми (рис. 5м).



**Рис. 5.** Морфология мандибул зоа III (а–е) и зоа V (ж–м) *Leonardsaxius amurensis*. а, в, и, л – вид со стороны жевательной поверхности; б, г, к, м – ряд шипов между резцовым и молярным отростками мандибул; д–з – дорсальная часть молярного отростка. Масштаб: а–г, и–м – 20 мкм; д–з – 10 мкм.

#### Мандибулы мегалопы *Boasaxius princeps* (рис. 6)

Мандибулы ложковидной формы, резцовый и молярный отростки расположены перпендикулярно друг к другу. Уплощенный слабоогнутый резцовый отросток направлен антеровентрально. Резцовый отросток левой мандибулы округлой формы, на его внутренней стороне в центральной части небольшое утолщение, вдоль режущего края видны небольшие шипы. На резцовом отростке правой мандибулы в центральной части режущего края заметный зубообразный выступ; шипы на внутренней стороне режущего края редкие и малозаметные. Молярный отросток широ-

кий, его боковая поверхность с внутренней стороны покрыта группами мелких плоских зубчиков. В месте соединения с резцом расположен тупой шип. Жевательная поверхность ограничена небольшим кутикулярным валиком, который прерывается на внутренней стороне молярного отростка. Мандибулярная пальпа трехчлениковая, на дистальном членике многочисленные перисто-зубчатые и перистые щетинки разной длины.

Мандибулы взрослых *Boasaxius princeps* (рис. 7а–7г) и *Leonardsaxius amurensis* (рис. 7д–7з)

Резцовый и молярный отростки сильно склеротизированные. Резцовый отросток мощный,

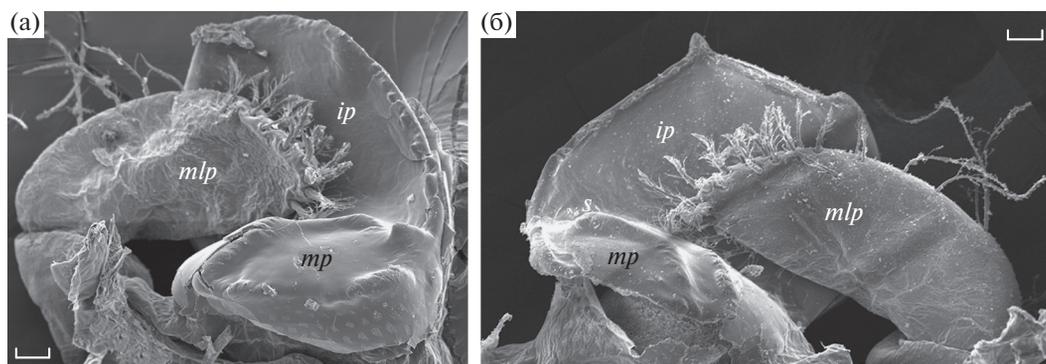


Рис. 6. Морфология левой (а) и правой (б) мандибул мегалопы *Boasaxius princeps*. Масштаб: 20 мкм.

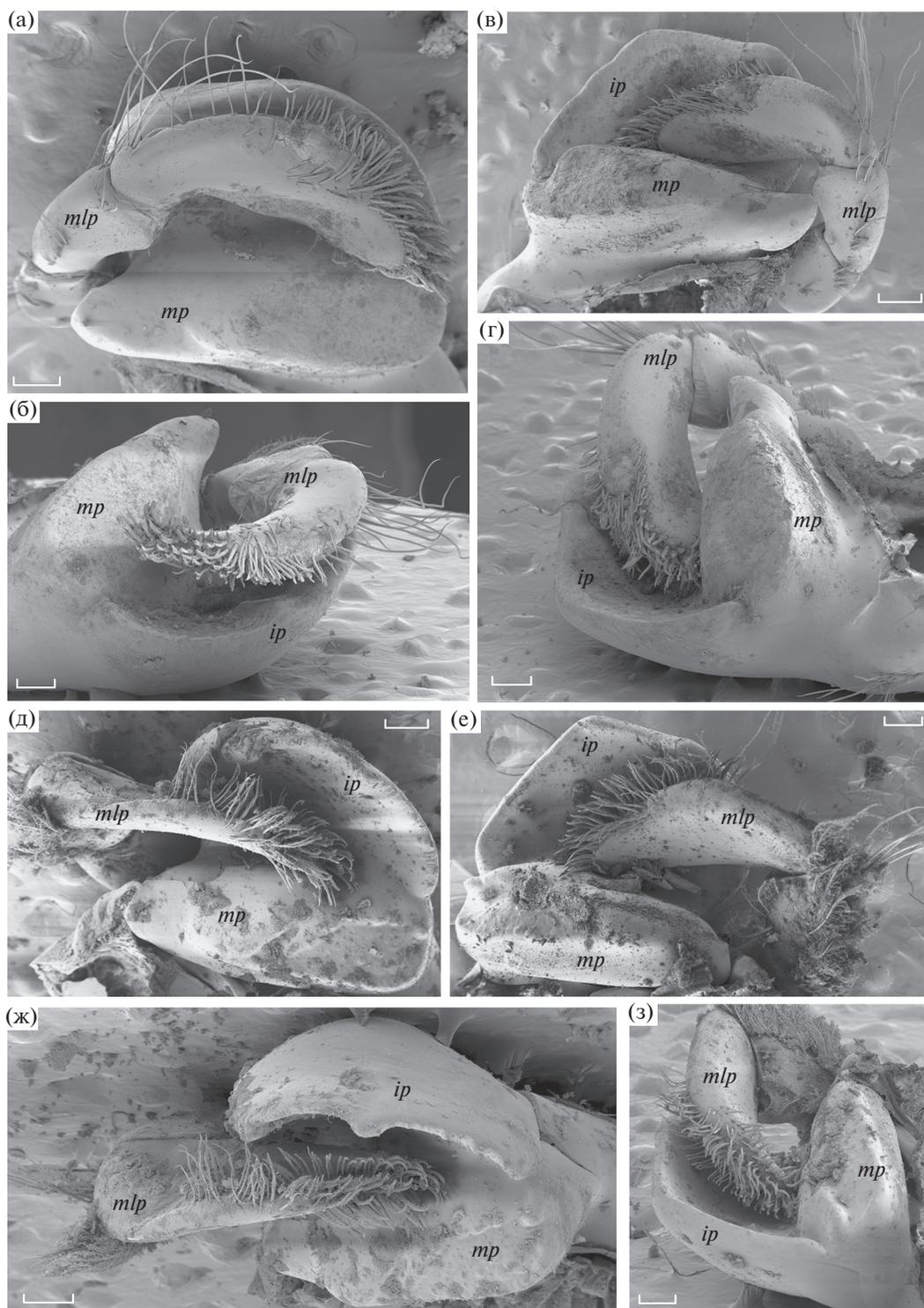
внутренне-вогнутый, вентральная (внешняя) поверхность гладкая. Край режцового отростка левой мандибулы скругленный (рис. 7а, 7д), правой – тупозаостренный (рис. 7в, 7е). На левой мандибуле с внутренней стороны резца небольшое утолщение, которое заканчивается тупым выступом на режущем крае, более заметным у *L. amurensis*. Режущий край левой мандибулы *B. princeps* гладкий; у *L. amurensis* на нем видны тонкие поперечные складки кутикулы и несколько мелких зубцов. Широкий сплюснутый молярный отросток расположен дорсально и кзади от резца, заострен с внешней стороны и слегка расширяется в медиальном направлении; рельеф жевательной поверхности состоит из небольших впадин и бугорков. У *L. amurensis* на медиальном крае жевательной поверхности обеих мандибул видны 1–2 небольших тупых шипа, которые не обнаружены у *B. princeps*. Внутренняя боковая поверхность молярного отростка покрыта группами мелких зубчиков. Пальпа прикрепляется на дорсолатеральной стороне мандибулы. Уплощенный дистальный членик мандибулярной пальпы, вооруженный многочисленными перисто-зубчатыми щетинками, лежит в борозде, образованной молярным и режцовым отростками. У обоих видов щетинки присутствуют и на двух других члениках пальпы. У *B. princeps* их вооружение состоит из редких простых и перистых щетинок, наиболее длинные из них расположены в дистальной части среднего и в проксимальной части дистального члеников. У *L. amurensis* на этих члениках перистые щетинки образуют густую бахрому.

### ОБСУЖДЕНИЕ

О биологии включенных в исследование видов аксиод известно немного. Тело *Boasaxius princeps* хорошо склеротизировано, покрыто пучками перистых щетинок; общая длина (*TL*) может достигать 200 мм, длина карапакса (*CL*) – 70–80 мм. У *Leonardsaxius amurensis* *TL* достигает 80 мм, *CL* – 30 мм; карапакс гладкий, с простыми щетинка-

ми на дорсальной поверхности. Известно, что *L. amurensis* строит норы на песчано-илистых или илистых грунтах, *B. princeps* – на песчаных, каменистых, гравийных или ракушечно-известняковых субстратах как под большими камнями, так и у основания валунов или камней, редко – на илистом дне (Margin, 2015). Сведения о пищевых предпочтениях видов отсутствуют. В процессе развития *B. princeps* проходит 8, а *L. amurensis* – 5 стадий зоэа и стадию мегалопы (Kornienko et al., 2014, 2018).

Исследование мандибул *L. amurensis* и *B. princeps* на разных стадиях развития показало, что у зоэа они обладают набором общих характеристик. Гнатальная часть мандибулы зоэа состоит из широкого молярного и уплощенного в передне-заднем направлении режцового отростков. Левый режцовый отросток сдвинут к передней (внешней) поверхности мандибулы, правый – к задней (внутренней). Жевательная поверхность молярного отростка, образованная поперечными кутикулярными гребнями с рядами мелких шипов на вершинах, на правой мандибуле овальной формы, на левой – почти треугольной. Для обоих видов характерно присутствие на молярном отростке кистевидных выростов – кутикулярных образований с крепким основанием и 3–7 зубцами на дистальном конце. Кистевидные выросты образуют по краям жевательной поверхности бахрому с открытыми промежутками (Edgcombe et al., 2003). У исследованных видов на левой мандибуле бахрому находится на внешнем крае молярного отростка, на правой мандибуле – на внутреннем. Между дистальными зубами режцового отростка и молярным отростком расположен промежуточный ряд шипов (Richter et al., 2002); форма, размер и количество шипов, составляющих этот ряд, на правой и левой мандибулах различаются. Асимметрию правой и левой мандибул усиливает присутствие на молярном отростке левой мандибулы крупного гладкого шипа, лежащего за пределами жевательной поверхности. Поскольку мандибулы исследованных ранее зоэа I *Nihonotry-*



**Рис. 7.** Морфология мандибул взрослых особей *Boasaxius princeps* (а–г) и *Leonardsaxius amurensis* (д–з). а, б, д, ж – левая мандибула; в, г, е, з – правая мандибула. Масштаб: 200 мкм.

*raea japonica* и *N. makarovi* (Callianassidae) обладают всеми перечисленными выше признаками (Корниенко, Голубинская, 2018), эти характеристики могут оказаться общими для представителей инфраотряда Axiidea.

В результате проведенного ранее исследования строения мандибул зоа I *N. japonica* и *N. makarovi* видоспецифических характеристик не обнаружено (Корниенко, Голубинская, 2018). В настоящей работе показано, что виды, принадлежащие к

разным родам, различаются строением дорсальной части молярного отростка мандибул и количеством гребней на жевательной поверхности. Различие на уровне семейств – вооружение резцового отростка, в дистальной части которого у *Leonardsaxius* и *Boasaxius* (семейство Axiidae) расположены 3 зуба, а у *Nihonotrypaea* (семейство Callianassidae) – 2 (Корниенко, Голубинская, 2018). Основной план строения мандибул сохраняется на всех стадиях зоэа, но от стадии к стадии увеличивается количество гребней на жевательной поверхности молярного отростка и число групп в промежуточном ряду шипов.

Сравнительный анализ собственных и литературных данных показал, что мандибулы зоэа исследованных нами видов Axiidea и личинок некоторых Caridea и Achelata обладают общими характеристиками. Если сходство с мандибулами зоэа креветок-палемонид (Geiselbrecht, Melzer, 2010; Batel et al., 2014) ограничено общей формой и строением резца, то у личинок каридной креветки *Lysmata amboinensis* (Lysmatidae), как и у зоэа *B. princeps* и *L. amurensis*, на молярном отростке присутствуют гребни и кистевидные выросты; между дистальными зубами резцового отростка и молярном расположен ряд шипов, количество которых в ряду, как и гребней на молярном отростке, увеличивается по мере развития зоэа (Tziouveli et al., 2011). У филосом Palinuridae стройный резцовый отросток мандибул также сильно уплощен в передне-заднем направлении и несет несколько крупных мощных терминальных зубов, между ними и молярным отростком находится ряд шипов (Wolfe, Felgenhauer, 1991; Johnston, Ritar, 2001). У отдельных видов, например, у лангуста *Jasus edwardsii*, на молярном отростке мандибулы филосом видны кистевидные выросты (Wolfe, Felgenhauer, 1991, см. рис. 6).

Известно, что в процессе развития декапод кардинальные изменения в строении мандибул происходят на стадии мегалопы при переходе к бентосному образу жизни (Factor, 1982; Minagawa, Takashima, 1994; Lumasag et al., 2007). Полученные нами результаты подтверждают справедливость этого и в отношении аксиид. На стадии мегалопы меняется взаимоположение резцового и молярного отростков, ширина резцового отростка заметно увеличивается, асимметрия правой и левой мандибул мегалопы ограничивается формой резцовых отростков и присутствием срединного зубца на режущем крае правой мандибулы. Кутикулярные образования на поверхности отростков почти полностью отсутствуют, мандибулярная пальпа становится трехчлениковой, на ее дистальном членике появляются щетинки. Общий план строения, характерный для мандибул мегалоп, сохраняется у взрослых особей, но мандибулы становятся более мощными, срединный зубец на правой мандибуле редуцируется, утол-

щение на внутренней стороне левого резцового отростка более заметно. Кутикулярные образования представлены мелкими зубчиками на внутренней боковой поверхности молярного отростка и щетинками на члениках пальпы. Форма и строение мандибул взрослых особей *B. princeps* и *L. amurensis* в целом соответствуют описанию этих придатков у декапод из инфраотрядов Axiidea и Gebiidea (Dworschak et al., 2012).

В немногочисленных исследованиях с помощью СЭМ мандибул взрослых бентосных Brachyura (Factor, 1982; Carvalho et al., 2017), Anomura (Garm, Høeg, 2000; Garm, 2004a; Jaszkwowiak et al., 2015), Astacidea и Achelata (Sahlmann et al., 2011) кутикулярные выросты на молярном и резцовом отростках также не обнаружены. В то же время внутри инфраотряда Caridea строение мандибул у видов различается не только наличием или отсутствием пальпы, разной формой и степенью развития молярного и резцового отростков (Felgenhauer, Abele, 1985; Storch et al., 2001; Буруковский, 2009; Ashelby et al., 2015), но и разнообразием типов кутикулярных образований на поверхности молярного отростка (Ashelby et al., 2015).

Изучение мандибул зоэа I девяти видов декапод, принадлежащих к разным инфраотрядам, показало, что в их строении присутствуют филогенетически важные признаки; предложен основной эволюционный тренд от стройной мандибулы, как у Caridea, к массивной и толстой мандибуле, как у Brachyura (Geiselbrecht, Melzer, 2010). Согласно нашим данным, у зоэа Gebiidea строение мандибул ближе к Anomura, а у Axiidea – к каридным креветкам (Корниенко, Голубинская, 2018).

В отличие от мандибул взрослых Reptantia, у которых, как отмечено выше, гнатальная часть мандибул не вооружена, у зоэа Brachyura, Anomura, Gebiidea, Axiidea и филосом Achelata на мандибулах присутствуют разнообразные кутикулярные выросты. У зоэа первых трех инфраотрядов они представлены отдельными мелкими зубцами, бугорками и шипами, которые в основном вооружают внешние края (Greenwood, Fielder, 1979; Factor, 1982; Minagawa, Takashima, 1994; Meyer et al., 2006; Lumasag et al., 2007; Geiselbrecht, Melzer, 2010; Корниенко, Голубинская, 2018). У всех исследованных видов Axiidea вооружение гнатальной доли мандибул зоэа состоит из кутикулярных выростов разных типов, которые на жевательной поверхности организованы в ряды и гребни, присутствует ряд шипов между резцовым отростком и жевательной поверхностью молярного отростка. И хотя описанные нами мандибулы взрослых Axiidea заметно отличаются от мандибул каридной креветки *Lysmata amboinensis*, состоящих только из молярного отростка с отчетливыми зубцами (Hayashi, 1975), строение мандибул зоэа *L. am-*

*boinensis* (см.: Tziouveli et al., 2011) демонстрирует сходство морфологии с мандибулами *Axiidea* не только в основной форме, но и в деталях строения гнатальной доли.

Наши исследования показали, что морфология мандибул зоа *Axiidea* соответствует базальной модели строения мандибул ракообразных: гнатальная доля мандибулы состоит из молярного и резцового отростков; поверхность молярного отростка формируют поперечные гребни с кистевидными выростами, которые на внешнем (левая мандибула) или внутреннем (правая мандибула) крае жевательной поверхности образуют открытую бахрому; между дистальными шипами резцового отростка и молярным отростком располагается ряд шипов, состоящий из нескольких групп шипов. Асимметрию правой и левой мандибул усиливает присутствие на молярном отростке левой мандибулы крупного гладкого шипа, лежащего за пределами жевательной поверхности. На стадии мегалопы при переходе от пелагического образа жизни к бентосному радикально изменяется форма мандибул, кутикулярные образования на поверхности молярного и резцового отростков редуцируются и у взрослых особей исчезают. Различия в строении мандибул зоа, незаметные у близкородственных видов (например, у *N. japonica* и *N. makarovi*), на уровне родов проявляются в разном количестве гребней на поверхности и в строении дорсальной части молярного отростка. Виды, принадлежащие к разным семействам, различаются по количеству терминальных зубцов на резцовом отростке. Несмотря на различия в морфологии мандибул взрослых особей, мандибулы зоа *Axiidea* демонстрируют заметное сходство с мандибулами личинок каридных креветок семейства *Lysmatidae*.

#### 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 благодарны руководителю отдела электронной микроскопии ННЦМБ ДВО РАН Д.В. Фоминову за техническую поддержку при работе с электронным микроскопом и профессору А.В. Чернышеву за критическое прочтение рукописи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Буруковский Р.Н. Питание и пищевые взаимоотношения креветок. Калининград: Изд-во ФГОУ ВПО "КГТУ". 2009. 409 с.
- Корн О.М., Голубинская Д.Д., Корниенко Е.С. Ключ для определения зоа роющих креветок инфраотрядов *Gebiidea* и *Axiidea* из залива Петра Великого Японского моря // Биол. моря. 2017. Т. 43. № 5. Р. 341–348.
- Корниенко Е.С., Голубинская Д.Д. Морфология мандибул зоа I роющих креветок родов *Upogebia* (*Gebiidea*) и *Nihonotrypaea* (*Axiidea*) // Биол. моря. 2018. Т. 44. № 4. С. 243–254.
- Ashelby C.W., De Grave S., Johnson M.L. Preliminary observations on the mandibles of palaemonoid shrimp (Crustacea: Decapoda: Caridea: Palaemonoidea) // PeerJ. 2015. V. 3. P. e846.
- Batel A., Melzer R.R., Anger K., Geiselbrecht H. Heterochrony in mandible development of larval shrimp (Decapoda: Caridea) – a comparative morphological SEM study of two carideans // J. Morphol. 2014. V. 275. P. 1258–1272.
- Bracken H.D., Toon A., Felder D.L. et al. The decapod tree of life: compiling the data and moving toward a consensus of decapod evolution // Arthropod Syst. Phyl. 2009. V. 67. P. 99–116.
- Carvalho D.A., Viozzi M.F., Collins P.A., Williner V. Functional morphology of comminuting feeding structures of *Trichodactylus borellianus* (Brachyura, Decapoda, Trichodactylidae), an omnivorous freshwater crab // Arthropod Struct. Dev. 2017. V. 46. P. 472–482.
- Clark P.F., Calazans D.K., Pohle G.W. Accuracy and standardization of brachyuran larval descriptions // Inverteb. Reprod. Dev. 1998. V. 33. P. 127–144.
- Dworschak P.R.C., Felder D., Tudge C.C. Infraorders *Axiidea* de Saint Laurent, 1979 and *Gebiidea* de Saint Laurent, 1979 (formerly known collectively as *Thalassiniidea*) // The Crustacea. Leiden; Boston: Brill. 2012. V. 9B. P. 109–220.
- Edgecombe G.D., Richter S., Wilson G.D.F. The mandibular gnathal edges: Homologous structures throughout Mandibulata? // Afr. Invertebr. 2003. V. 44. P. 115–135.
- Factor J.R. Morphology of the mouthparts of larval lobsters, *Homarus americanus* (Decapoda: Nephropidae), with special emphasis on their setae // Biol. Bull. 1978. V. 154. P. 383–408.
- Factor J.R. Development and metamorphosis of the feeding apparatus of the stone crab, *Menippe mercenaria* (Brachyura, Xanthidae) // J. Morphol. 1982. V. 172. P. 299–312.
- Felgenhauer B.E., Abele L.G. Feeding structures of two atyid shrimps, with comments on caridean phylogeny // J. Crustacean. Biol. 1985. V. 5. P. 397–419.
- Garm A. Mechanical functions of setae from the mouth apparatus of seven species of decapod crustaceans mandible // J. Morphol. 2004a. V. 260. P. 85–100.
- Garm A. Revising the definition of the crustacean seta and setal classification systems based on examinations of the mouthpart setae of seven species of decapods // Zool. J. Linn. Soc. Lond. 2004b. V. 142. P. 233–252.

- Garm A., Høeg J.T. Functional mouthpart morphology of the squat lobster *Munida sarsi*, with comparison to other anomurans // Mar. Biol. 2000. V. 137. P. 123–138.
- Geiselbrecht H., Melzer R.R. Mandibles of zoea I larvae of nine decapod species: a scanning EM analysis (Crustacea, Decapoda) // Spixiana. 2010. V. 33. P. 27–47.
- Griffis R.B., Suchanek T.H. A model of burrow architecture and trophic modes in thalassinidean shrimp (Decapoda: Thalassinidea) // Mar. Ecol.: Prog. Ser. 1991. V. 79. P. 171–183.
- Greenwood J.G., Fielder D.R. The zoeal stages and megalopa of *Portunus rubromarginatus* (Lanchester) (Decapoda: Portunidae), reared in the laboratory // J. Plankton Res. 1979. V. 1. P. 191–205.
- Hayashi K.-I. *Hippolysmata grabhami* Gordon, a synonym of *Lysmata amboinensis* (De Man) (Decapoda, Caridea, Hippolytidae) // Publ. Seto Mar. Biol. Lab. 1975. V. 22. P. 285–296.
- Hyžný M., Klompmaker A.A. Systematics, phylogeny, and taphonomy of ghost shrimps (Decapoda): a perspective from the fossil record // Arthropod Syst. Phylog. 2015. V. 73. P. 401–437.
- Jaszkowiak K., Keiler J., Wirkner C.S., Richter S. The mouth apparatus of *Lithodes maja* (Crustacea: Decapoda) – form, function and biological role // Acta Zool. 2015. V. 96. P. 401–417.
- Johnston D.J., Ritar A. Mouthpart and foregut ontogeny in phyllosoma larvae of the spiny lobster *Jasus edwardsii* (Decapoda: Palinuridae) // Mar. Freshwater Res. 2001. V. 52. P. 1375–1386.
- Johnston M., Johnston D., Knott B. Ontogenetic changes in the structure and function of the mouthparts and foregut of early and late stage *Panulirus ornatus* (Fabricius, 1798) phyllosomata (Decapoda: Palinuridae) // J. Crustacean Biol. 2008. V. 28. P. 46–56.
- Kornienko E.S., Korn O.M., Golubinskaya D.D. The complete larval development of the lobster shrimp *Boasaxius princeps* Boas, 1880 (Decapoda: Axiidea: Axiidae) obtained in the laboratory // J. Nat. Hist. 2014. V. 48. P. 1737–1769.
- Kornienko E.S., Golubinskaya D.D., Korn O.M., Sharina S.N. The complete description of larval stages of the lobster shrimp *Leonardsaxius amurensis* (Kobjakova, 1937) (Decapoda: Axiidea: Axiidae) identified by DNA barcoding // J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 2018. V. 98. P. 1435–1453.
- Lavalli K.L., Factor J.R. Functional morphology of the mouthparts of juvenile lobsters, *Homarus americanus* (Decapoda: Nephropidae), and comparison with the larval stages // J. Crustacean Biol. 1992. V. 12. P. 467–510.
- Lin F.-J., Liu Y., Sha Z. et al. Evolution and phylogeny of the mud shrimps (Crustacea: Decapoda) revealed from complete mitochondrial genomes // BMC Genomics. 2012. V. 13. P. 631.
- Lumasag G.J., Quintino E.T., Aguilar R.O. et al. Ontogeny of feeding apparatus and foregut of mud crab *Scylla serrata* Forsskål larvae // Aquacult. Res. 2007. V. 38. P. 1500–1511.
- Marin I. Complete morphological re-description of mud-dwelling axiid *Leonardsaxius amurensis* (Kobjakova, 1937) with remarks on Axiidae (Crustacea: Decapoda: Axiidea) from the Russian coast of the Sea of Japan // Zootaxa. 2015. V. 3937. P. 549–563.
- Meyer R., Melzer R.R. Scanning EM diagnosis of marine Decapoda larvae: a comparison of preparation techniques // Crustaceana. 2004. V. 77. P. 883–886.
- Meyer R., Wehrmann I.S., Melzer R.R. Morphology of the first zoeal stage of *Portunus acuminatus* Stimpson, 1871 (Decapoda: Portunidae: Portuninae) reared in the laboratory // Sci. Mar. 2006. V. 70. P. 261–270.
- Minagawa M., Takashima F. Developmental changes in larval mouthparts and foregut in the red frog crab, *Ranina ranina* (Decapoda: Raninidae) // Aquaculture. 1994. V. 126. P. 61–71.
- Nickell L.A., Atkinson R.J.A. Functional morphology of burrows and trophic modes of three thalassinidean shrimp species, and a new approach to the classification of thalassinidean burrow morphology // Mar. Ecol.: Prog. Ser. 1995. V. 128. P. 181–197.
- Nickell L.A., Atkinson R.J.A., Pinn E.H. Morphology of thalassinidean (Crustacea: Decapoda) mouthparts and pereopods in relation to feeding, ecology and grooming // J. Nat. Hist. 1998. V. 32. P. 733–761.
- Pinn E.H., Nickell L.A., Rogerson A., Atkinson R.J.A. Comparison of the mouthpart setal fringes of seven species of mud-shrimp (Crustacea: Decapoda: Thalassinidea) // J. Nat. Hist. 1999. V. 33. P. 1461–1485.
- Poore G.C.B., Ahyong S.T., Bracken-Grissom H.D. et al. On stabilising the names of the infraorders of thalassinidean shrimps, Axiidea de Saint Laurent, 1979 and Gebiidea de Saint Laurent, 1979 (Decapoda) // Crustaceana. 2014. V. 87. P. 1258–1272.
- Richter S., Edgecombe G.D., Wilson G.D.F. The *lacinia mobilis* and similar structures – a valuable character in Arthropod phylogenetics? // Zool. Anz. 2002. V. 241. P. 339–361.
- Robles R., Tudge C.C., Dworschak P.C. et al. Molecular phylogeny of the Thalassinidea based on nuclear and mitochondrial genes // Decapod crustacean phylogenetics (Crustacean Issues). London; New York: CRC Press. 2009. V. 18. P. 309–326.
- Sahlmann C., Chan T.-Y., Chan B.K.K. Feeding modes of deep-sea lobsters (Crustacea: Decapoda: Nephropidae and Palinuridae) in Northwest Pacific waters: Functional morphology of mouthparts, feeding behaviour and gut content analysis // Zool. Anz. 2011. V. 250. P. 55–66.
- Sakai K. Axiidea of the world and a reconsideration of the Callianassoidea (Decapoda, Thalassinidea, Callianassida) // Crustaceana Monographs. Leiden: Brill. 2011. V. 13. 520 p.
- Sakai K. Descriptions of eight species from the superfamilies Axiidea Huxley, 1879 and Callianassoidea Dana, 1852, with a revised key to the species of the genus *Acanthaxius* Sakai & De Saint Laurent, 1989 (Decapoda, Callianassida) // Crustaceana. 2017. V. 90. P. 177–197.
- Stamhuis E.J., Dauwe B., Videler J.J. How to bite the dust: morphology, motion pattern and function of the feeding appendages of the deposit-feeding thalassinid shrimp *Callianassa subterranea* // Mar. Biol. 1998. V. 132. P. 43–58.
- Storch V., Bluhm B.A., Arntz W.E. Microscopic anatomy and ultrastructure of the digestive system of three Antarctic shrimps (Crustacea: Decapoda: Caridea) // Polar Biol. 2001. V. 24. P. 604–614.

Tudge C.C., Asakura A., Ahyong S.T. Infraorder Anomura MacLeay, 1838 // *The Crustacea*. Leiden; Boston: Brill. 2012. V. 9B. P. 221–335.

Tziouveli V., Bastos-Gomez G., Bellwood O. Functional morphology of mouthparts and digestive system during larval development of the cleaner shrimp *Lysmata amboin-*

*ensis* (de Man, 1888) // *J. Morphol.* 2011. V. 272. P. 1080–1091.

Wolfe S.H., Felgenhauer B.E. Mouthpart and foregut ontogeny in larval, postlarval, and juvenile spiny lobster, *Panulirus argus* Latreille (Decapoda, Palinuridae) // *Zool. Scr.* 1991. V. 20. P. 51–75.

## The Morphology of the Mandibles of Larval and Adult Lobster Shrimps *Boasaxius princeps* and *Leonardsaxius amurensis* (Decapoda: Axiidea: Axiidae)

E. S. Kornienko<sup>a</sup> and D. D. Golubinskaya<sup>a</sup>

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

The morphology of the mandibles in the lobster shrimps *Boasaxius princeps* (Boas, 1880) and *Leonardsaxius amurensis* (Kobjakova, 1937) is described in different stages of ontogenesis. The incisor process of the mandibles in axiid zoeae is flattened antero-posteriorly, with 3 stout terminal teeth; the molar process is broad, the grinding surface is formed by transverse cuticular ridges and bears a fringe of brush-like projections on the anterior edge of the left mandible and on the posterior edge of the right mandible; between the incisor process' terminal teeth and the molar process is a spine row formed by groups of spines. The general plan of structure of mandibles is retained in all zoeal stages; the number of transverse ridges on the molar process and the number of spine groups in the spine row increase as the larvae develop. In the megalopa stage, the mandible shape changes: the incisor process becomes broad and concave, the molar process is perpendicular to it; spines and ridges on the grinding surface of the molar process get reduced, small spines on the incisor process are retained on the cutting edge. Adult lobster shrimp lack cuticular structures on the molar and incisor processes of the mandibles. Despite the marked differences in the adult mandible morphology, the mandibles of the zoeae of Axiidea show similarity to the mandibles of the larvae of some caridean shrimps (e.g., the family Lysmatidae).

**Keywords:** Lobster shrimps, zoea, megalopa, mandible morphology, gnathal edge

УДК 639.2:574.5:547.458.63

## ОСОБЕННОСТИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ГЛИКОГЕНА В МЫШЦАХ И ПЕЧЕНИ У РЫБ РАЗНОЙ ПЛАВАТЕЛЬНОЙ СПОСОБНОСТИ ПОСЛЕ ВЫЛОВА ДОННЫМ ТРАЛОМ

© 2020 г. Е. Н. Силкина<sup>1,\*</sup>, Ю. А. Силкин<sup>1</sup>, М. Ю. Силкин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского – природный заповедник РАН, Феодосия 298100, Россия

\*e-mail: ysilkina@mail.ru

Поступила в редакцию 22.05.2019 г.

После доработки 10.10.2019 г.

Принята к публикации 12.10.2019 г.

Исследовали динамику восстановления гликогена в мышцах и печени камбалы *Plathichthys flesus* (Linnaeus, 1758) и шпрота *Sprattus sprattus* (Linnaeus, 1758) после воздействия тралового лова. Показано, что при стрессовом воздействии лова содержание гликогена в органах у малоподвижной камбалы мало изменялось, а у активно плавающего шпрота оно снижалось в белых, красных мышцах и печени. Динамика восстановления гликогена в органах камбалы после воздействия лова имела волновой характер, в результате этого полное восстановление гликогена происходило через 12 ч и сопровождалось 100% выживаемостью рыб. Предполагается, что ресинтез гликогена в органах камбалы происходил за счет активизации метаболизма углеводов в печени. У шпрота, помещенного после лова для восстановления гликогена в тканях в 100-литровый аквариум, через 3 ч “отдыха” наблюдалось увеличение в 4.5 раза уровня полисахарида в белых мышцах при низком содержании гликогена в печени. Компенсация гликогена у шпрота происходила, очевидно, за счет реверсного вовлечения лактата в ресинтез полисахарида в белых мышцах. Последующие 3 ч “отдыха” характеризовались значительным снижением уровня гликогена в белых мышцах (в 1.7 раза) по сравнению с его концентрацией в предыдущий восстановительный период. За весь период “отдыха” восстановления гликогена в печени шпрота не происходило. По-видимому, данный орган не участвовал в процессах восстановления полисахарида. Низкая выживаемость шпрота (30%) обусловлена длительным стрессовым воздействием, вызванным как поимкой, так и аквариумным содержанием этого “возбужденного” вида рыб.

**Ключевые слова:** гликоген, стресс, восстановление, выживаемость, мышцы, печень, рыбы

**DOI:** 10.31857/S0134347520040075

В обменных процессах в тканях рыб гликоген является важным энергетическим субстратом, так как окисляется с выделением энергии без использования кислорода. В многочисленных исследованиях было показано, что при интенсивных мышечных нагрузках гликоген служит “запальным топливом”, обеспечивающим мгновенное включение двигательной активности рыб. В этих условиях запасы гликогена в мышцах истощаются (Black et al., 1962; Морозова и др., 1978; Силкина, 1991). Пути его восстановления до сих пор обсуждаются в литературе и до настоящего времени являются сложным, а также малоизученным направлением исследований физиологии и биохимии (West T.G. et al., 1994; Weber et al., 2016).

В мышцах высших позвоночных гликоген, использованный при гипоксии, обычно окисляется до лактата, который поступает в печень и восстанавливается до глюкозы. Образующаяся глюкоза

поступает в мышцы при активации гликогенсинтетазы и превращается в гликоген (Кухта и др., 2008). У рыб эти процессы выражены не так ярко и имеют особенности. Было показано, что мышцы рыб слабо используют глюкозу крови и она не является основным субстратом для восстановления гликогена (Frolow, Milligan, 2004). Другие исследователи установили, что только 10% лактата, образующегося в мышцах, выделяется в кровь у форели и 3% у камбалы (Pagnotta, Milligan, 1991). Таким образом, у рыб использование лактата печенью для превращения его в глюкозу, а затем в гликоген представляется маловероятным процессом. Регуляция восстановления гликогена в мышцах рыб тоже имеет особенности. Канадские ученые установили, что не только гормоны стресса оказывают влияние на гликогенез, но и количество остаточного гликогена в мышцах является

регулятором синтеза данного полисахарида в локомоторном органе (Frolow, Milligan, 2004).

Для рыб попадание в трал — это большое стрессовое воздействие. Кроме того, в процессе траления рыба, пытаясь покинуть трал, совершает броски и расходует значительное количество мышечного гликогена. Ответная реакция на стресс и мышечную нагрузку у разных видов рыб существенно различается. Это обусловлено особенностями их стрессоустойчивости и локомоторными возможностями. К рыбам, имеющим разную реакцию на стресс и плавательную активность, относятся черноморская речная камбала *Plathichthys flesus* (Linnaeus, 1758) и шпрот *Sprattus sprattus* (Linnaeus, 1758).

Шпрот в Черном море встречается повсеместно, в наибольшем количестве у юго-восточных берегов Крыма и в северо-восточной части кавказского побережья. Это холодолюбивый вид. Рыба довольно быстрая, постоянно находится в движении, не наделена стрессоустойчивостью и может образовывать большие скопления. Длительных миграций не совершает (Световидов, 1964). Шпрот считается “жирной” рыбой, содержание жира в его органах в некоторые периоды года превышает 12%. Основные запасы липидов сосредоточены в белых мышцах, что отличает шпрота от так называемых тощих рыб (скорпена, налим и т.д.), у которых основные жировые запасы накапливаются в печени (Шульман, 1972; Милюк и др., 1997).

Речная камбала по образу жизни отличается от шпрота. Она относится к донным малоподвижным хищным рыбам; приспособлена к резким колебаниям солености, температуры и гипоксии, т.е. это стрессоустойчивый вид. Больших миграций камбала не совершает и является промысловым видом (Световидов, 1964).

Цель настоящей работы — изучение динамики восстановления гликогена в мышцах и печени камбалы *P. flesus* и шпрота *S. sprattus* после стрессового воздействия, вызванного попаданием в донный трал.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Рыбы были отловлены у кавказского и крымского побережий Черного моря в июне 2013 г. при температуре воды от 12 до 15°C. Придонное траление происходило со скоростью 6.5–8.5 км/ч в течение 30 мин на глубине 35–40 м. Часть рыб, взятых из трала, сразу подвергали биохимическому анализу, других рыб помещали в емкости с проточной морской водой объемом 100 л для “отдыха”. Исследовано 27 экз. камбалы и 42 экз. шпрота. Камбала была представлена только самками с гонадами на III–IV стадиях зрелости. Масса тела рыб составляла  $131.0 \pm 12.0$  г, длина те-

ла —  $23.6 \pm 1.7$  см. У шпрота это также были самки с массой тела  $7.4 \pm 0.7$  г и длиной  $10.8 \pm 0.7$  см, имевшие гонады на IV стадии зрелости.

Содержание гликогена в тканях рыб определяли по общепринятой методике, основанной на цветной реакции с антроном (Seifter et al., 1950). У шпрота концентрацию гликогена определяли в белых и красных мышцах, а также в печени. У камбалы анализировали только белые мышцы и печень, так как красные мышцы у этого вида камбалы почти отсутствовали (менее 1%). Навески тканей (белые мышцы — 100 мг, красные мышцы — 50 мг, печень — 20 мг) брали у рыб, находившихся в холодильной камере при температуре  $-17^\circ\text{C}$ . Содержание гликогена в тканях оценивали у рыб разного физиологического состояния: а) стрессовое состояние после трала, б) состояние восстановления (“отдых”) в течение 1, 3, 6 и 12 ч. Полученные результаты выражали в мг% сырой массы тканей, динамику изменения концентрации гликогена ( $\Delta\text{Сгл.} = \text{Сгл. “отдых”} - \text{Сгл. трал}$ ) в тканях рыб — в процентах. Рассчитывали среднее арифметическое  $\pm$  стандартное отклонение этих показателей. Все результаты получены при проведении 6–11 независимых экспериментов. Значимость различий оценивали с использованием критерия Стьюдента; различия считали значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Колебание уровня гликогена в органах рыб после воздействия тралового лова и в период восстановления имело тканевые и видовые особенности. Содержание гликогена в печени и белых мышцах камбалы после пребывания рыб в трале было высоким. В печени камбалы оно было в 6 раз выше, чем в мышцах, и составляло 3025.0 и 486.0 мг% соответственно (табл. 1). В первый час “отдыха” после траления содержание гликогена в белых мышцах камбалы увеличилось на 38%. В печени, напротив, было отмечено снижение концентрации гликогена на 63% по сравнению с таковой у рыб, извлеченных из трала (рис. 1).

В последующие 3 ч “отдыха” динамика тканевого содержания гликогена ( $\Delta\text{Сгл.}$ ) у камбалы сильно изменилась. В белых мышцах она стремительно снизилась и была в 3.3 раза ниже, чем после первого часа “отдыха”. Концентрация гликогена в белых мышцах камбалы за 3 ч “отдыха” снизилась на 59% по сравнению с таковой после поимки. В печени наблюдалось такое же быстрое восстановление концентрации гликогена, которая в 2 раза превышала его содержание после первого часа “отдыха”, но была на 22% ниже, чем сразу после траления. Последующее время “отдыха” характеризовалось продолжением восстановления уровня гликогена в мышцах и печени камбалы: в белых мышцах в этот период гликоге-

**Таблица 1.** Содержание гликогена в белых мышцах и печени камбалы

Показатель	Камбала							
	из трала		в состоянии “отдыха”					
			1 ч		3 ч		12 ч	
	мышцы	печень	мышцы	печень	мышцы	печень	мышцы	печень
Среднее значение, мг%	486	3205	670*	1187*	200**	2487	543	3731
Стандартное отклонение	50	381	53	101	24	250	60	402
Объем выборки, экз.	12	13	7	9	7	7	6	6

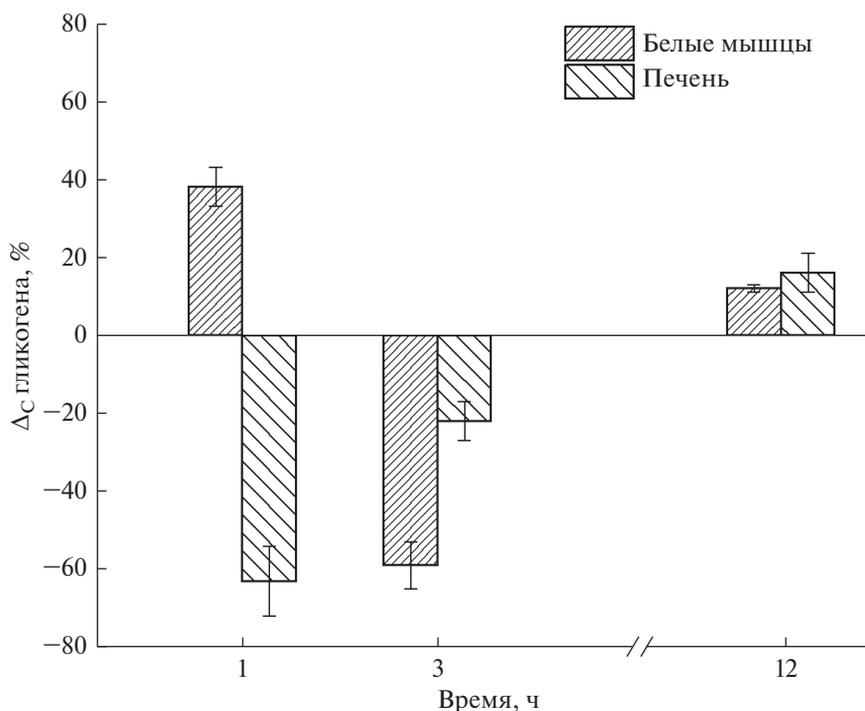
\*Значимое различие между содержанием гликогена в тканях при поимке камбалы и после “отдыха” ( $p < 0.05$ ); \*\*значимое различие содержания гликогена в мышцах между выборками 1- и 3-часового “отдыха” ( $p < 0.05$ ).

на было в 1.1 раза, а в печени — в 1.2 раза больше, чем у рыб, извлеченных из трала (табл. 1, рис. 1). В экспериментах все подопытные особи *Plathichthys flesus* остались живыми в течение периода “отдыха”.

После траления в мышцах и печени шпрота концентрация гликогена была низкой и на порядок отличалась от таковой в тканях камбалы. В мышцах шпрота гликогена было в 3–3.5 раза меньше, чем в печени. Различий в уровне остаточного гликогена между белыми и красными мышцами у шпрота не выявлено. У большинства рыб в состоянии относительного покоя уровень

гликогена в красных мышцах был в 3–5 раз выше, чем в белых (табл. 2).

В восстановительный период в мышцах и печени шпрота, в отличие от таковых камбалы, не было отмечено дальнейшего снижения концентрации гликогена ниже уровня, характерного для рыб сразу после вылова (табл. 2). Через 3 ч содержания рыб в искусственных условиях покоя в белых мышцах наблюдали самый высокий прирост концентрации гликогена, которая почти в 5 раз превышала ее начальное значение. В красных мышцах концентрация гликогена увеличилась в меньшей степени и составляла 69% (рис. 2). На этом этапе “отдыха” рыб соотношение концен-



**Рис. 1.** Динамика изменения концентрации гликогена в белых мышцах и печени камбалы в процессе “отдыха” через 1, 3 и 12 ч. Здесь и на рис. 2: концентрация гликогена у рыб, взятых на анализ при подъеме трала, принята за 100% как нулевой уровень.

**Таблица 2.** Содержание гликогена в мышцах и печени шпрота

Показатель	Шпрот								
	из трала			в состоянии “отдыха”					
				3 ч			6 ч		
	б. м.	кр. м.	печ.	б. м.	кр. м.	печ.	б. м.	кр. м.	печ.
Среднее значение, мг%	65	71	243	305*	120*	259	178**	150**	247
Стандартное отклонение	7	8	25	7	5	30	19	5	29
Объем выборки, экз.	10	10	11	7	7	9	6	6	7

Примечание. Б. м. – белые мышцы; кр. м. – красные мышцы; печ. – печень. \*Значимое различие между содержанием гликогена в тканях при поимке шпрота и после “отдыха” ( $p < 0.05$ ); \*\*значимое различие содержания гликогена в мышцах между выборками после 3- и 6-часового “отдыха” ( $p < 0.05$ ).

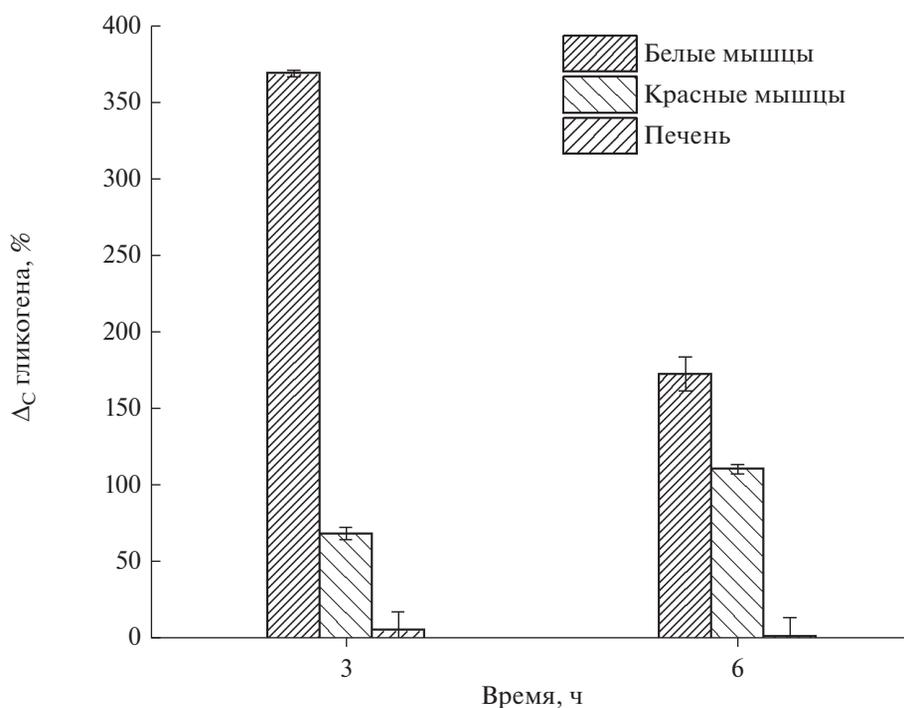
трации гликогена в двух типах мышц было нестандартным: в белых мышцах концентрация гликогена была в 2.5 раза выше, чем в красных (табл. 2). В дальнейшем отмечено снижение концентрации гликогена в белых мышцах; к концу шестого часа эксперимента она была почти в 2 раза ниже, чем через 3 ч “отдыха”, но на 174% превышала уровень гликогена, зарегистрированный у рыб сразу после поимки. В красных мышцах шпрота в последующие 3 ч “отдыха” концентрация гликогена увеличилась на 42% по сравнению с таковой в первые 3 ч наблюдений (рис. 2) и была на 211% выше, чем у рыб сразу после поимки (табл. 2). Содержание гликогена в печени шпрота

оставалось неизменным в течение всего эксперимента (табл. 2, рис. 2).

В процессе экспериментов в течение периода “отдыха” живыми остались 30% подопытных особей *Sprattus sprattus*.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Гликоген как энергетический субстрат, обладающий легкой мобилизуемостью, высокой степенью восстанавливаемости и способностью освобождать энергию в анаэробных условиях, играет важную роль в метаболизме рыб. Как известно, это основной источник энергии при анаэробном состоянии организма. В теле рыб гликоген в основ-



**Рис. 2.** Динамика изменения концентрации гликогена в тканях шпрота в процессе 3- и 6-часового “отдыха”.

ном локализован в печени и мышцах. Его содержание в скелетных мышцах у активных форм (в нашем случае – это шпрот) ниже, чем у малоактивных форм (оседлые формы рыб, в нашем случае – камбала). Содержание гликогена в печени, мозге и сердце также выше у малоподвижных рыб по сравнению с таковым у активно плавающих видов (Плисецкая, 1972; Морозова и др., 1978). Эти особенности в содержании гликогена в тканях рыб, различающихся уровнем естественной подвижности, несомненно, связаны с повышенной ролью гликолитического пути мобилизации энергии у малоподвижных форм по сравнению с таковой у активных видов рыб. Тем не менее, значение углеводов в метаболизме активных видов рыб тоже очень важно (Шульман, 1972; Эмеретли, Русинова, 2001).

Проведенные исследования по влиянию траления на содержание гликогена в тканях рыб выявили различия в их ответе на стрессовую нагрузку. В тканях шпрота уровень гликогена снизился почти до нулевых отметок, тогда как в тканях камбалы в течение 30 мин поимки и траления он сохранялся на довольно высоком уровне (табл. 1, 2). На наш взгляд, решающую роль играет видовая стрессоустойчивость рыб.

Камбала – стрессоустойчивый вид, который не относится к активно плавающим рыбам. Попав в трал, она не может совершать интенсивные движения из-за своей плоскотелой формы и ограниченного пространства. Эти условия, по-видимому, способствовали минимизации энергетических затрат, а также наблюдаемому отсутствию снижения уровня гликогена в мышцах и печени рыб сразу после траловой поимки. Однако стрессовое воздействие лова на организм рыб, как известно, сопровождается выбросом гормонов тревоги – катехоламинов (адреналин, норадреналин) и пептидного гормона глюкагона (Плисецкая, 1972), которые способны вызвать активацию гликогенолиза уже после поимки, в период так называемого отдыха рыб. В первый час “отдыха” особенно интенсивный гликогенолиз наблюдался в печени камбалы; по-видимому, он необходим для регенерационной компенсации последствий стресса в тканях и для поддержания углеводного баланса гликогена, а также для стабилизации уровня глюкозы в крови рыб. После трех часов относительного покоя на фоне роста глюконеогенеза в печени за счет увеличения двигательной активности рыб в аквариумах, а также, по-видимому, из-за влияния еще довольно высокого уровня стрессовых гормонов наблюдалось более чем двукратное снижение концентрации гликогена в белых мышцах рыб.

Как показали недавно проведенные исследования, мышцы рыб обладают определенным свойством в отношении расхода или накопления

гликогена под действием гормонов (Frolow, Milligan, 2004). При высоком содержании гликогена в мышцах (более 5 мкмоль/г, что соответствует 90 мг%) гормоны стресса стимулируют активность гликогенфосфорилазы и активизируют гликогенолиз. Колебания уровня содержания гликогена в мышцах рыб в первые 3 ч “отдыха” соответствовали установленным нами закономерностям (табл. 1, рис. 1). При более длительном 12-часовом “отдыхе” рыб наблюдалось полное восстановление запасов гликогена в мышцах и печени камбалы, что свидетельствовало о преодолении рыбами стрессовых последствий траловой поимки. Выживаемость камбалы в этих условиях составила 100%.

Таких рыб, как хамса, сельдь, ставрида, сарган и шпрот, многие исследователи относят к “легковозбудимым” рыбам (Шульман и др., 1978; Минюк и др., 1997). Для этих рыб характерно высокое содержание катехоламинов в крови (адреналин, норадреналин), а также пептидного гормона глюкагона и стероидного гормона кортизола в ответ на стресс от поимки и транспортировки (Плисецкая, 1975). В данных условиях гормоны стресса сложным опосредованным путем вызывают стимуляцию в тканях гликогенфосфорилазы – регуляторного фермента, который мобилизует гликоген в мышцах и других тканях для компенсации энергетических издержек в ответ на внешние воздействия. Гликогенфосфорилаза является регуляторным ферментом гликогенолиза, интенсивность которого за считанные секунды может более чем в 10 раз увеличиваться под действием этого фермента (Хочачка, Сомеро, 1977). Траление по своему физиологическому воздействию на шпрота можно приравнять к плаванию с максимальной скоростью. Как было установлено ранее (Силкина, 1991), после такого режима нагрузки падение уровня гликогена в мышцах рыб приобрело драматический характер.

Базовый (контрольный) уровень гликогена в тканях шпрота нам неизвестен. Можно полагать, что шпрот, будучи холодолюбивым оксифильным видом, относится к рыбам с активным липидным обменом и, возможно, поэтому изначально не имеет больших запасов полисахарида в организме. Тем не менее, можно приблизительно оценить концентрацию гликогена до траления, сравнив ее с таковой в мышцах и печени другого “жирного” черноморского вида со сходными физиолого-биохимическими характеристиками – барабули *Mullus barbatus ponticus*. Это придонная рыба, имеющая активный липидный метаболизм (Шульман и др., 1978). Более ранние исследования, проведенные нами, показали, что в белых и красных мышцах барабули уровень гликогена в покое составлял соответственно 134.0 и 371.0 мг%. Содержание гликогена в печени этой рыбы не превышало 1665.0 мг%, что является довольно

низким показателем по сравнению с таковым у других видов (Силкина, 1991). Таким образом, уровень гликогена в белых мышцах шпрота в состоянии покоя мог колебаться в пределах 120–150.0 мг%, в красных мышцах ~300–350.0 мг%, а в печени ~1300–1700.0 мг%.

Траловую поимку для шпрота можно считать стрессом антропогенной природы, которая, по-видимому, соответствует пределу адаптационных возможностей данного вида. Подтверждением этому служит низкая (30%) выживаемость шпрота в процессе “отдыха”. Динамика быстрого восстановления гликогена в мышцах шпрота после трех часов “отдыха” и его снижение в белых мышцах через 6 ч свидетельствовали о противоречивом характере данного процесса. Четырехкратное увеличение содержания гликогена в белых мышцах и почти двукратное – в красных мышцах шпрота через 3 ч “отдыха” стимулировали интерес к рассмотрению вопроса о метаболитах и механизмах, обеспечивающих такую впечатляющую динамику восстановления резервов мышечного гликогена. Можно предположить, что для восстановления мышечного гликогена задействована глюкоза, которую легко доставить в мышцы по транспортной системе крови. Однако наши данные свидетельствуют о том, что у шпрота после траления в основном “депо” резервного гликогена (в печени) данного субстрата почти нет. Это полностью исключает глюкозу из процесса мышечного глюконеогенеза в восстановительном периоде. Кроме того, при изучении роли глюкозы крови рыб в восстановлении мышечного гликогена после изнурительных нагрузок получен отрицательный ответ. В экспериментах, проведенных на форели *Oncorhynchus mykiss* и зимней камбале *Pseudopleuronectes americanus*, было убедительно показано, что глюкоза крови рыб не вносит значительного вклада в восстановление мышечного гликогена. Поэтому, в отличие от млекопитающих, у рыб цикл Кори не играет заметной роли в тканевом обмене глюкозы и гликогена (Pagnotta, Milligan, 1991). Однако быстрое восстановление гликогена в мышцах шпрота в период “отдыха” показывает, что в мышцах рыб существует мощная регенерационная система глюконеогенеза, позволяющая быстро восстанавливать израсходованные запасы гликогена. Недавние исследования свидетельствуют о том, что восстановление гликогена в мышцах рыб осуществляется путем реверсивного использования лактата, накопленного в процессе гипоксии и физической нагрузки (Weber et al., 2016).

Высокая гликолитическая способность мышц рыб известна давно, как и способность накапливать и переносить большие концентрации молочной кислоты (Хочачка, Сомеро, 1977). Лактат играет важную роль в углеводном метаболизме рыб не только как конечный продукт гликолиза, но и

как субстрат для глюконеогенеза и внутриклеточной сигнализации (Philp et al., 2005). Показано, что накопленный в белых мышцах рыб лактат выделяется в кровь в 10 раз медленнее, чем из мышц у млекопитающих (Wang et al., 1997). Это обусловлено малым числом транспортеров в мембранах мышечных клеток рыб по сравнению с таковым у млекопитающих (Omlin, Weber, 2013). Поэтому мышцы рыб в отношении превращений гликогена ведут себя как квазизакрытая система, распад и ресинтез которого осуществляются по внутриклеточному замкнутому циклу (Weber et al., 2016). Глюконеогенезу из лактата в мышцах рыб после поимки должен способствовать и низкий уровень гликогена. Как показали Фролов и Миллиган (Frolow, Milligan, 2004), на фоне низкой концентрации гликогена и высокого уровня мышечного лактата у рыб происходит резкая активация глюконеогенеза. Скорее всего, низкий уровень гликогена и, возможно, накопление высоких концентраций лактата в мышечных клетках у шпрота после поимки и обеспечивали быстрое реверсное превращение лактата в гликоген у этого вида во время 3-часового “отдыха”.

Через 6 ч восстановительного периода реверсное накопление гликогена было отмечено только в красных мышцах шпрота. В белых мышцах наблюдалось снижение концентрации гликогена, а в печени после траления уровень гликогена не изменялся в течение всего восстановительного периода (табл. 2, рис. 2). Отсутствие положительной динамики в восстановлении гликогена в белых мышцах и печени шпрота можно объяснить неспособностью этого вида рыб преодолеть последствия гормональной “бури” в организме, вызванной поимкой. Хотя аквариумы для рыб значительно лучше, чем трал, но шпрот, по-видимому, в этих условиях также переживает стресс неволи, активно передвигаясь. Исследования показывают, что гормоны стресса (адреналин, норадреналин, кортизол) в крови вызывают изменение микровязкости плазматических мембран эритроцитов, что может приводить к катастрофическим последствиям для организма. Структурные переходы с повышением микровязкости в области липид-липидных и белок-липидных взаимодействий приводят к затруднению передвижения эритроцитов рыб в капиллярах и способствуют развитию диффузионной гипоксии. Особенно опасны эти процессы в сердечной мышце, так как диффузионная гипоксия способна вызвать ее остановку. У теплокровных животных и человека данное явление получило название коронарного синдрома Х и проявляется внезапной остановкой сердца у спортсменов на ответственных соревнованиях (Панин и др., 2012). Необходимо отметить, что мы неоднократно наблюдали большую смертность “возбудимых” рыб (ставрида, барабуля, сельдь, сарган, хамса) при транспортировке их с ме-

ста вылова в море до аквариального комплекса. При этом транспортируемые рыбы не испытывали недостатка в кислороде и не подвергались воздействию неблагоприятных температурных условий, кроме стресс-фактора беспокойства процесса поимки и самой транспортировки в аквариумы. Можно полагать, что в данном случае гибель рыб была обусловлена нарушениями, связанными с коронарным синдромом X. Низкая выживаемость шпрота (30%), по нашему мнению, также связана с нарушением гормонами “стресса” вязкостных характеристик крови, что приводит к гибели рыб.

### 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 выполнена в рамках темы гос. задания № АААА-А19-119012490045-0 “Изучение фундаментальных физических, физиолого-биохимических, репродуктивных, популяционных и поведенческих характеристик морских гидробионтов”.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кухта В.К., Морозкина Т.Е., Олецкий З.И., Таганович А.Д.* Биологическая химия: учебник. Минск: Асар. М.: Изд-во БИНОМ. 2008. 688 с.
- Минюк Г.С., Шульман Г.Е., Щепкин В.Я., Юнева Т.В.* Черноморский шпрот (связь динамики липидов с биологией и промыслом). Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика. 1997. 137 с.
- Морозова А.Л., Астахова Л.П., Силкина Е.Н.* Углеводный обмен при плавании рыб, глава VII // Элементы физиологии и биохимии общего и активного обмена у рыб. Киев: Наукова думка. 1978. С. 122–143.
- Панин Л.Е., Мокрушников П.В., Князев Р.А. и др.* Гормоны стресса и коронарный синдром X (экспериментальные исследования) // Атеросклероз. 2012. Т. 8. № 2. С. 5–13.
- Плисецкая Э.М.* О гормональной регуляции углеводного обмена у низших позвоночных (круглоротых и рыб): Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Ленинград. 1972. 38 с.
- Плисецкая Э.М.* Гормональная регуляция углеводного обмена у низших позвоночных. Л.: Наука. 1975. 215 с.
- Световидов А.Н.* Рыбы Черного моря. М.; Л.: Наука. 1964. 551 с.
- Силкина Е.Н.* Особенности углеводного обмена в скелетных мышцах и печени рыб различной естественной подвижности: Дис. ... канд. биол. наук. Ленинград. 1991. 139 с.
- Хочачка П., Сомеро Д.* Стратегия биохимической адаптации. М.: Мир. 1977. 398 с.
- Шульман Г.Е.* Физиолого-биохимические особенности годовых циклов рыб. М.: Пищ. пром-сть. 1972. 336 с.
- Шульман Г.Е., Щепкин В.Я., Яковлева К.К., Хоткевич Т.В.* Липиды и их использование при плавании рыб // Элементы физиологии и биохимии общего и активного обмена у рыб. Киев: Наукова думка. 1978. С. 100–121.
- Эмеретли И.В., Русинова О.С.* Активность ферментов основных путей окисления углеводов в тканях рыб // Гидробиол. журн. 2001. Т. 37. № 1. С. 79–81.
- Black E.C., Connor A.R., Lam K.-C. et al.* Changes in glycogen, pyruvate and lactate in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during and following muscular activity // J. Fish. Res. Board. Can. 1962. V. 19. P. 409–436.
- Frolow J., Milligan C.L.* Hormonal regulation of glycogen metabolism in white muscle slices from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) // Am. J. Physiol.: Regul., Integr. Comp. Physiol. 2004. 287. P. R1344–R1353.
- Omlin T., Weber J.-M.* Exhausting exercise and tissue-specific expression of monocarboxylate transporters in rainbow trout // Am. J. Physiol.: Regul., Integr. Comp. Physiol. 2013. V. 304. P. R1036–R1043.
- Pagnotta A., Milligan C.L.* The role of blood glucose in the restoration of muscle glycogen during recovery from exhaustive exercise in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) // J. Exp. Biol. 1991. V. 161. P. 489–508.
- Philp A., Macdonald A.L., Watt P.W.* Lactate – a signal coordinating cell and systemic function // J. Exp. Biol. 2005. V. 208. P. 4561–4575.
- Seifter S., Dayton S., Novic B., Muntwyler E.* The estimation of glycogen with the anthrone reagent // Arch. Biochem. Biophys. 1950. V. 25. № 1. P. 191–200.
- West T.G., Schulte P.M., Hochachka P.W.* Implications of hyperglycemia for post-exercise resynthesis of glycogen in trout skeletal muscle // J. Exp. Biol. 1994. V. 189. P. 69–84.
- Wang Y., Wright P.M., Heigenhauser G.J., Wood C.M.* Lactate transport by rainbow trout white muscle: kinetic characteristics and sensitivity to inhibitors // Am. J. Physiol.: Regul., Integr. Comp. Physiol. 1997. V. 272. P. R1577–R1587.
- Weber J.-M., Choi K., Gonzalez A., Omlin T.* Metabolic fuel kinetics in fish: swimming, hypoxia and muscle membranes // J. Exp. Biol. 2016. V. 219. P. 250–258.

## The Pattern of Glycogen Recovery in Muscles and Liver of Fishes with Different Swimming Capabilities after being Caught in a Bottom Trawl

E. N. Silkina<sup>a</sup>, Yu. A. Silkin<sup>a</sup>, and M. Yu. Silkin<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*T.I. Vyzemsky Karadag Scientific Station, Nature Reserve, Russian Academy of Sciences, Feodosia 298100, Russia*

The dynamics of glycogen recovery in muscles and liver of the European flounder *Plathichthys flesus* (Linnaeus, 1758) and the European sprat *Sprattus sprattus* (Linnaeus, 1758) after exposure to trawl fishing has been studied. As the results show, the stress-inducing effect of fishing does not alter the glycogen content of the organs in flounder that leads a sedentary life, whereas a sharp decrease in glycogen is observed in white, red muscles, and liver of sprat, an actively swimming species. After the exposure to fishing, the dynamics of glycogen recovery in the organs of flounder has an undulatory pattern. The complete recovery of glycogen occurs within 12 h and is accompanied by a 100% survival rate of flounder. The assumption is made that the resynthesis of glycogen in the organs of flounder is due to the activation of carbohydrate metabolism in the liver. In the sprat that had 3 h of “rest” after being caught and then placed in a 100-liter tank to restore glycogen in tissues, a pronounced (4.5-fold) increase in the level of the polysaccharide was recorded from white muscles, with a simultaneously low glycogen level in the liver. The glycogen compensation in the sprat occurred possibly through the reverse involvement of lactate in the polysaccharide resynthesis in white muscles. The following additional 3-hour rest period was characterized by a significant (1.7-fold) decrease in the glycogen level in white muscles compared to that in the previous rest period. No glycogen recovery in the sprat liver was observed throughout the entire rest period. Apparently, this organ is not involved in the polysaccharide recovery processes. The low survival rate of sprat (30%) is explained by the long exposure to stress caused by both catching and captivity in the tank, to which this species is particularly sensitive.

*Keywords:* glycogen, stress, recovery, survival rate, muscles, liver, fish

УДК 577.121+615.324

## ВЛИЯНИЕ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА ЭКСТРАКТА ИЗ МОРСКОЙ КРАСНОЙ ВОДОРОСЛИ *Ahnfeltia tobuchiensis* (KANNO et MATSUBARA) МАКИЕНКО НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЛАЗМЫ КРОВИ И МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ СТРЕССЕ

© 2020 г. Н. Ф. Кушнерова<sup>1</sup>, \*, С. Е. Фоменко<sup>1</sup>, В. Г. Спрыгин<sup>1</sup>, Т. В. Момот<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН, Владивосток 690041, Россия

<sup>2</sup>Дальневосточный федеральный университет, Владивосток 690950, Россия

\*e-mail: nkushnerova@poi.dvo.ru

Поступила в редакцию 20.05.2019 г.

После доработки 10.10.2019 г.

Принята к публикации 28.11.2019 г.

Исследовано влияние липидного комплекса, выделенного из водно-спиртового (70%) экстракта морской красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis*, и коммерческого препарата “Эссенциале” на биохимические показатели плазмы крови и мембран эритроцитов мышей при экспериментальном стрессе (вертикальная фиксация за дорсальную шейную складку). Фармакологический эффект липидного комплекса *A. tobuchiensis* проявлялся в снятии дислипидемии и гиперхолестеринемии, что сопровождалось снижением содержания общих липидов, липопротеинов низкой плотности, а также увеличением содержания липопротеинов высокой плотности в плазме крови, нормализацией соотношения холестерин/фосфолипиды и фосфолипидного состава мембран эритроцитов. По эффективности экстракт анфельции не уступал эталонному препарату “Эссенциале”, а по способности восстанавливать липидный состав крови и соотношению фосфолипидных фракций в мембранах эритроцитов превосходил таковой. Фармакологический эффект липидного комплекса анфельции обусловлен действием входящих в его состав фосфолипидных фракций и полиненасыщенных жирных кислот семейств n-6 и n-3, которые способствуют утилизации холестерина из мембран и восстановлению соотношения липопротеинов в пользу увеличения липопротеинов высокой плотности, а также участвуют в репарации мембран эритроцитов.

**Ключевые слова:** *Ahnfeltia tobuchiensis*, стресс, кровь, эритроциты, липопротеины, холестерин, фосфолипиды

**DOI:** 10.31857/S0134347520040051

Морские водоросли представляют собой важный биоресурс для получения пищевых продуктов и фармакологических препаратов. Они являются объектом марикультуры, так как служат богатым источником биологически активных соединений, среди которых полисахариды, липиды, полифенолы, белки, витамины, минералы и др. Полисахариды из морских гидробионтов получили широкое применение для профилактики и лечения дислипидемий (Крыжановский и др., 2016; Аминина, 2017), а также как иммуномодулирующие и противовоспалительные средства (Запорожец, Беседнова, 2007). С этой целью широко используются препараты из бурых водорослей *Saccharina japonica*, *Fucus distichus* subsp. *evanescens* и других видов. Экстракты из *S. japonica* и *Sargassum pallidum*, обогащенные полифенольными соединениями, оказывали выраженное антиоксидантное

и гепатопротекторное действие при экспериментальных гепатозах (Спрыгин и др., 2013, 2017). Липидный комплекс представляет одну из наиболее значимых групп биологически активных веществ, характеризующих фармакологическую ценность водорослей, так как в своем составе содержит метаболиты для биохимических реакций: моно-, ди- и триацилглицерины, гликолипиды, полярные липиды, эссенциальные фосфолипиды и полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) семейств n-6 и n-3 (Гончарова и др., 2004; Sanina et al., 2008; Имбс и др., 2009). Недостаток этих компонентов в повседневном питании, а также нарушения метаболических реакций липидного обмена при воздействии на организм различных стрессовых факторов (физические, химические, психоэмоциональные и др.) могут приводить к развитию широкого спектра заболеваний (атеро-

склероз, гипертония, язвы желудочно-кишечного тракта и др.). Известно, что липидная фракция экстракта из морской зеленой водоросли *Ulva lactuca* при экспериментальном стрессе оказывала выраженное профилактическое действие, которое проявлялось в сохранении липидного обмена печени, ее антиоксидантной защиты, а также в снижении уровня перекисного окисления липидов (Фоменко и др., 2016). Одним из наиболее богатых сырьевых источников липидных комплексов являются красные водоросли, в том числе широко распространенный вид *Ahnfeltia tobuchiensis* (Kanno et Matsubara) Makienko. Она относится к отделу красных водорослей Rhodophyta порядку анфельциевых Ahnfeltiales семейству Ahnfeltiaceae. Это многолетнее жесткое кустистое плотнохрящеватое растение высотой до 10 см от темного буровато-красного до почти черного цвета (Титлянов, Титлянова, 2012). *A. tobuchiensis* формирует пласт толщиной от 10 см до 1 м над илистым и илисто-песчаным дном на глубине от 2 до 30 м. В талломе *A. tobuchiensis* содержится высокий процент веществ липидной природы. Фосфолипидный состав представлен фосфатидилхолином, фосфатидилглицерином, фосфатидилэтаноламином и фосфатидилинозитом (Хотимченко, 2003; Гончарова и др., 2004). Важным элементом гликолипидной и фосфолипидной фракции является высокое содержание ПНЖК семейств n-6 и n-3 (арахионовая, эйкозапентаеновая, докозагексаеновая жирные кислоты) (Khotimchenko, Vaskovsky, 1990; Хотимченко, 2003; Sanina et al., 2004), что может обуславливать высокую фармакологическую активность липидного комплекса.

В настоящее время в экспериментальных исследованиях на лабораторных животных в качестве модели стресса применяют вертикальную фиксацию за дорсальную шейную складку (Кушнерова и др., 2005). В данной модели проявляются все атрибуты стресса (гипертрофия надпочечников, инволюция тимуса и селезенки, изъязвления слизистой желудка и кишечника), а также метаболические нарушения в крови и печени, обусловленные активацией радикальных реакций и перекисного окисления липидов. В результате изменяется соотношение липидных компонентов мембран и повышается их проницаемость (Момот и др., 2016). Таким образом, липидная составляющая мембран эритроцитов является тонким показателем, определяющим состояние мембран других клеток органов и тканей на уровне организма (Эндакова и др., 2002). Все это предполагает стресс-протекторное действие липидного комплекса красных водорослей, обусловленное репарацией мембранных структур. Однако анфельция как сырье для получения лекарственных препаратов и биологически активных добавок в фармацевтической промышленности не используется, хотя применяется для получения агар-ага-

ра и йода. В настоящее время в качестве средств, восстанавливающих структуру мембран, используют коммерческий препарат “Эссенциале®” форте Н (Sanofi, Франция), в составе которого содержится фосфатидилхолин соевых бобов в комбинации с линолевой, линоленовой и олеиновой жирными кислотами. Из-за высокой стоимости данный зарубежный препарат малодоступен для большей части населения, поэтому очевидна необходимость поиска местного природного сырья для импортозамещения, которым и может быть липидный комплекс анфельции.

Цель настоящей работы – изучение влияния липидного комплекса экстракта морской красной водоросли *A. tobuchiensis* на липидный состав крови и мембран эритроцитов при экспериментальном стрессе.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Образцы водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis* (100 талломов) собирали в летний период в б. Дарагана (о-в Попова, зал. Петра Великого Японского моря), тщательно очищали от эпифитов и частиц песка, промывали сначала морской, а затем дистиллированной водой и сушили при температуре не менее 50°C. Высушенный таллом измельчали с помощью лабораторной мельницы до частиц размером 0.5–1.0 мм и экстрагировали 70% этиловым спиртом в объемном соотношении 1 : 2 (сырье : экстрагент). Данный способ переработки морских водорослей позволяет извлекать основную часть липидного комплекса без полисахаридной составляющей (Спрыгин и др., 2012). При определении количественного состава экстракта среди биологически активных фракций доминирующей была липидная фракция, поэтому стандартизацию экстракта из анфельции проводили по суммарному содержанию липидов и дозу вводимого препарата рассчитывали в миллиграммах общих липидов на 1 кг массы тела животного. В липидном комплексе экстракта анфельции гликолипиды составляли 30.3%, нейтральные липиды – 44.0% и фосфолипиды – 25.7% (табл. 1). Среди нейтральных липидов преобладали триацилглицерины. В составе липидного комплекса также присутствовали моноацилглицерины + диацилглицерины, свободные жирные кислоты, свободные стеринны и эфиры стериннов. Фосфолипидный комплекс характеризовался наличием в своем составе четырех известных представителей класса фосфолипидов, обладающих репаративными свойствами: фосфатидилхолина, фосфатидилглицерина, фосфатидилэтаноламина и фосфатидилинозита. В составе жирных кислот присутствовали насыщенные кислоты ( $26.50 \pm 0.32\%$ ), моноеновые кислоты ( $24.86 \pm 0.53\%$ ), представители семейства n-6 линолевая и арахидоновая кислоты ( $27.94 \pm 0.38\%$ ), а также семейства n-3 линоленовая

**Таблица 1.** Химический состав липидного комплекса экстракта морской красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis*

Биохимические параметры	Значение
Общие липиды, мг/г сухой ткани	15.35 ± 0.22
Общие фосфолипиды, мг/г сухой ткани	3.95 ± 0.23
Общие нейтральные липиды, мг/г сухой ткани	6.76 ± 0.43
Общие гликолипиды, мг/г сухой ткани	4.64 ± 0.34
Фракции нейтральных липидов, % от суммы всех фракций	
Диацилглицерины + моноацилглицерины	15.16 ± 0.56
Свободные стеринны	13.21 ± 0.89
Свободные жирные кислоты	13.31 ± 0.38
Триацилглицерины	43.45 ± 2.35
Эфиры стериннов	10.95 ± 0.44
Остаточная фракция	3.92 ± 0.25
Фракции фосфолипидов, % от суммы всех фракций	
Фосфатидилхолин	64.80 ± 1.72
Фосфатидилглицерин	20.85 ± 1.62
Фосфатидилэтаноламин	8.20 ± 0.12
Фосфатидилинозит	6.15 ± 0.13
Жирная кислота, % от суммы всех жирных кислот	
Миристиновая (14:0)	2.00 ± 0.17
Пальмитиновая (16:0)	19.53 ± 0.65
Стеариновая (18:0)	4.97 ± 0.14
Пальмитолеиновая (16:1 n-9)	3.70 ± 0.11
Цис-вакценовая (18:1 n-7)	1.50 ± 0.03
Олеиновая (18:1 n-9)	19.66 ± 1.68
Линолевая (18:2 n-6)	1.70 ± 0.07
Арахидоновая (20:4 n-6)	26.24 ± 0.68
Линоленовая (18:3 n-3)	0.50 ± 0.02
Эйкозапентаеновая (20:5 n-3)	20.20 ± 0.43

Примечание. Здесь и в табл. 2 приведена средняя ± ошибка средней.

и эйкозапентаеновая кислоты (20.70 ± 0.33%). Количественные характеристики фосфолипидов и жирных кислот экстракта согласуются с литературными данными (Хотимченко, 2003; Гончарова и др., 2004; Sanina et al., 2008).

Эксперимент проводили на беспородных мышах-самцах с массой тела 25–27 г, содержащихся в стандартных условиях вивария и на стандартном рационе питания. Острый стресс моделировали при вертикальной фиксации животных за дорсальную шейную складку в течение 24 ч. Контрольных животных содержали в стандартных условиях вивария. Препараты вводили в желудок через зонд дважды: непосредственно перед вертикальной фиксацией и через 6 ч после первого введения. Перед введением липидный комплекс водоросли разводили в вазелиновом масле таким образом, чтобы необходимая доза исследуемого препарата (2 мг на особь массой 25 г) содержалась

в 0.2 мл. Это соответствует известной дозе препарата сравнения “Эссенциале®” (80 мг/кг) в экспериментальных исследованиях на животных (Саратиков и др., 2004). Животным контрольной группы и группы “стресс” вводили одинаковый объем медицинского вазелинового масла, которое является химически инертным и не оказывает влияния на результаты эксперимента (Саратиков и др., 2004).

В ходе исследования были выделены четыре группы по 10 животных: 1-я группа – контроль, 2-я группа – стресс (вертикальная фиксация), 3-я группа – “стресс” + липидный комплекс анфельции и 4-я группа – “стресс” + “Эссенциале”. Животных выводили из эксперимента декапитацией под легким эфирным наркозом.

Плазму крови и эритроциты выделяли общепринятым методом центрифугирования (Новгородцева и др., 2003). Для получения мембранной

массы эритроциты вносили в дистиллированную воду, где происходил их полный гемолиз. Содержание общего холестерина, общих фосфолипидов и липопротеинов в плазме крови определяли с помощью диагностических наборов “Ольвекс-диагностикум” (Россия). Экстракты общих липидов из плазмы крови и мембран эритроцитов готовили по методу Фольча (Folch et al., 1957). Количество общих липидов в экстракте определяли весовым методом. Суспензию силикагеля марки “КСК”, а также пластинки размером  $6 \times 6$  см для двумерной микротонкослойной хроматографии фосфолипидов и нейтральных липидов готовили по методу Светашева и Васковского (Svetachev, Vaskovsky, 1972). Для фракционного разделения фосфолипидов использовали системы растворителей, описанные Роузером (Rouser et al., 1967). Для обнаружения холинсодержащих фосфолипидов (фосфатидилхолин, лизофосфатидилхолин, сфингомиелин) использовали реактив Драгендорфа (Wagner et al., 1961); липиды проявлялись в виде оранжевых пятен на желтом фоне. Для обнаружения фосфолипидов, содержащих аминокетилэтанолламин, фосфатидилсерин), пластинки опрыскивали 5% раствором нингидрина в ацетоне (Rouser et al., 1967) и нагревали в течение 2–3 мин над парами воды до появления розовых пятен на белом фоне. Фосфолипиды, содержавшие гидроксильные группы (фосфатидилинозит), обнаруживали с помощью периодатного реактива Шиффа (Кейтс, 1975); пятна липидов имели розово-сиреневый цвет. Для проявления всех фосфолипидных фракций применяли молибдатный реактив (Vaskovsky et al., 1975) и реагент на основе малахитового зеленого (Vaskovsky, Latyshev, 1975). При этом липиды проявлялись в виде синих или зеленых пятен на белом фоне. Для количественного определения фракций использовали 10% раствор серной кислоты в метаноле с последующим нагреванием. Содержание отдельных фракций фосфолипидов и общих фосфолипидов рассчитывали, как предложено ранее (Vaskovsky et al., 1975). Фракционное разделение нейтральных липидов для выделения фракции холестерина в липидном экстракте из мембран эритроцитов осуществляли с помощью метода одномерной микротонкослойной хроматографии на силикагеле (Amenta, 1964). Содержание отдельных фракций выражали в процентах от общей суммы фосфолипидов и нейтральных липидов соответственно.

Количественные данные обрабатывали с использованием статистического пакета InStat 3.0 (GraphPad, Software Inc. USA, 2005) со встроенной процедурой проверки соответствия выборки закону нормального распределения. Для определения статистической значимости различий в зависимости от параметров распределения использовали пара-

метрический *t*-критерий Стьюдента или непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При вертикальной фиксации животных за дорсальную шейную складку в течение 24 ч масса надпочечников увеличилась на 53% ( $3.17 \pm 0.03$  мг по сравнению с  $2.07 \pm 0.02$  мг в контроле,  $p < 0.001$ ), масса селезенки снизилась на 29% ( $0.15 \pm 0.01$  мг по сравнению с  $0.21 \pm 0.01$  мг в контроле,  $p < 0.01$ ) и появились язвенные поражения слизистой оболочки желудка ( $2.6 \pm 0.1$  шт/животное, в контроле – 0); эти признаки являются известными атрибутами стресса.

Влияние стресса сопровождалось изменением биохимических показателей в плазме крови и мембранах эритроцитов (табл. 2), которые характеризовались увеличением содержания общих липидов в 1.5 раза ( $p < 0.001$ ) и общего холестерина на 49% ( $p < 0.01$ ) при одновременном снижении содержания общих фосфолипидов на 15% ( $p < 0.001$ ). Это обусловило увеличение соотношения холестерин/фосфолипиды на 74% ( $p < 0.001$ ), которое является показателем развития гиперхолестеринемии. Содержание липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) снизилось на 40% ( $p < 0.001$ ) при одновременном увеличении концентрации липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) на 36% ( $p < 0.01$ ). Таким образом, при стрессе формировалась выраженная картина дислипидемии.

При стрессе в мембранах эритроцитов изменялось соотношение липидных составляющих. В эритроцитарных мембранах воздействие стресса сопровождалось снижением содержания фосфатидилхолина (ФХ) на 10% ( $p < 0.01$ ) и фосфатидилэтанолламина (ФЭ) на 7% ( $p < 0.05$ ) (табл. 2). Одновременно происходило равнозначное увеличение содержания лизофосфатидилхолина (ЛФХ) и фосфатидной кислоты (ФК) на 35% ( $p < 0.001$ ), обусловленное активацией фосфолипаз. Под действием стресса в мембране эритроцитов повышалось содержание сфингомиелина (СМ) на 12% ( $p < 0.001$ ), что является компенсаторной реакцией на снижение содержания ФХ и повышение проницаемости мембран. Наблюдалось снижение содержания фосфатидилсерина (ФС) на 7% ( $p < 0.05$ ) и увеличение такового фосфатидилинозита (ФИ) на 67% ( $p < 0.001$ ). Изменение в соотношении метаболически активных фракций фосфолипидов (ФС, ФИ, ФК) предполагает изменение активности мембраносвязанной  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -АТФазы (Satoh et al., 1993). В мембране эритроцитов отмечали повышение содержания холестерина на 13% ( $p < 0.001$ ).

Введение липидного комплекса анфельции и “Эссенциале” сопровождалось выраженной тенденцией к восстановлению нарушенных стрессом биохимических показателей крови и мембран

**Таблица 2.** Влияние липидного комплекса анфельции и “Эссенциале” на биохимические показатели плазмы крови и мембран эритроцитов животных при воздействии стресса

Показатель	1-я группа, контроль	2-я группа, стресс	3-я группа, стресс + анфельция	4-я группа, стресс + “Эссенциале”
Плазма крови				
Общие липиды, г/л	4.62 ± 0.17	6.00 ± 0.21 <sup>3</sup>	4.73 ± 0.15 <sup>B</sup>	5.15 ± 0.13 <sup>1,6*</sup>
Общие фосфолипиды, ммоль/л	2.46 ± 0.07	2.10 ± 0.06 <sup>3</sup>	2.51 ± 0.08 <sup>B</sup>	2.33 ± 0.07 <sup>A</sup>
Холестерин, ммоль/л	2.82 ± 0.05	4.20 ± 0.07 <sup>2</sup>	3.15 ± 0.16 <sup>B</sup>	3.50 ± 0.07 <sup>3,В,*</sup>
Холестерин/фосфолипиды	1.15 ± 0.01	2.00 ± 0.02 <sup>3</sup>	1.25 ± 0.06 <sup>B</sup>	1.50 ± 0.03 <sup>3,В***</sup>
ЛПНП, ммоль/л	0.61 ± 0.04	0.83 ± 0.05 <sup>2</sup>	0.61 ± 0.05 <sup>б</sup>	0.66 ± 0.04 <sup>A</sup>
ЛПВП, ммоль/л	1.72 ± 0.08	1.03 ± 0.05 <sup>3</sup>	1.69 ± 0.07 <sup>B</sup>	1.45 ± 0.06 <sup>1,В*</sup>
Фосфолипидные фракции мембран эритроцитов				
ФХ	30.92 ± 0.58	27.83 ± 0.56 <sup>2</sup>	31.06 ± 0.59 <sup>B</sup>	30.70 ± 0.55 <sup>б</sup>
ЛФХ	2.84 ± 0.13	3.82 ± 0.09 <sup>3</sup>	2.90 ± 0.07 <sup>B</sup>	3.12 ± 0.06 <sup>В*</sup>
СМ	24.61 ± 0.36	27.50 ± 0.42 <sup>3</sup>	24.58 ± 0.50 <sup>B</sup>	24.77 ± 0.32 <sup>B</sup>
ФЭ	26.93 ± 0.53	25.27 ± 0.51 <sup>1</sup>	26.73 ± 0.44 <sup>A</sup>	26.64 ± 0.33 <sup>A</sup>
ФС	11.24 ± 0.17	10.42 ± 0.30 <sup>1</sup>	11.26 ± 0.24 <sup>A</sup>	11.10 ± 0.18 <sup>A</sup>
ФИ	1.53 ± 0.18	2.55 ± 0.15 <sup>3</sup>	1.55 ± 0.10 <sup>B</sup>	1.57 ± 0.11 <sup>B</sup>
ФК	1.93 ± 0.07	2.61 ± 0.07 <sup>3</sup>	1.92 ± 0.06 <sup>B</sup>	2.10 ± 0.05 <sup>В*</sup>
ХС	21.88 ± 0.46	24.73 ± 0.35 <sup>3</sup>	21.76 ± 0.45 <sup>B</sup>	22.07 ± 0.50 <sup>B</sup>

Примечание. Различия статистически достоверны при: <sup>1</sup> $p < 0.05$ , <sup>2</sup> $p < 0.01$ , <sup>3</sup> $p < 0.001$  по сравнению с контролем; <sup>A</sup> $p < 0.05$ , <sup>б</sup> $p < 0.01$ , <sup>B</sup> $p < 0.001$  по сравнению со 2-й группой; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  по сравнению с 3-й группой. ЛПНП – липопротеины низкой плотности, ЛПВП – липопротеины высокой плотности; ФХ – фосфатидилхолин, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, СМ – сфингомиелин, ФЭ – фосфатидилэтанолламин, ФС – фосфатидилсерин, ФИ – фосфатидилинозит, ФК – фосфатидная кислота, ХС – холестерин.

эритроцитов, однако степень выраженности нормализующего эффекта различалась. При введении липидного комплекса анфельции (3-я группа животных) и препарата сравнения “Эссенциале” (4-я группа) при стрессе отмечали значимые различия величин с таковыми во 2-й группе (“стресс”) (табл. 2). Содержание общих липидов в плазме крови при введении липидного комплекса анфельции снизилось на 22% ( $p < 0.001$ ), а при введении “Эссенциале” – на 15% ( $p < 0.01$ ). При этом содержание общих фосфолипидов увеличилось на 20% ( $p < 0.001$ ) (3-я группа) и 11% ( $p < 0.05$ ) (4-я группа), а содержание холестерина снизилось на 25% ( $p < 0.001$ ) и 17% ( $p < 0.001$ ) соответственно. В результате соотношение холестерина/фосфолипиды при введении липидного комплекса анфельции снизилось на 37% ( $p < 0.001$ ), а при введении “Эссенциале” – на 25% ( $p < 0.001$ ). Содержание ЛПНП в плазме крови животных при введении липидного комплекса анфельции снизилось на 26% ( $p < 0.01$ ), а при введении “Эссенциале” – на 20% ( $p < 0.05$ ). Одновременно увеличилась концентрация ЛПВП в плазме крови животных 3-й группы на 64% ( $p < 0.001$ ), а 4-й группы – на 41% ( $p < 0.001$ ).

В то же время при введении “Эссенциале” при стрессе сохранились статистически достоверные различия с контролем. Содержание общих липи-

дов превышало контроль на 11% ( $p < 0.05$ ), холестерина – на 24% ( $p < 0.001$ ), а соотношение холестерина/фосфолипиды – на 30% ( $p < 0.001$ ) при одновременном снижении содержания ЛПВП на 16% ( $p < 0.05$ ).

В мембранах эритроцитов также отмечали статистически достоверные различия в содержании фосфолипидных фракций и холестерина при введении препаратов (3-я и 4-я группы) по сравнению с показателями в группе “стресс” (табл. 2). При введении липидного комплекса анфельции наблюдалось увеличение содержания ФХ на 12% ( $p < 0.001$ ) и ФЭ на 6% ( $p < 0.05$ ). При введении “Эссенциале” содержание ФХ увеличилось на 10% ( $p < 0.01$ ), а ФЭ – на 5% ( $p < 0.05$ ). При введении липидного комплекса анфельции одновременно снизилось содержание ЛФХ на 24% ( $p < 0.001$ ) и ФК на 26% ( $p < 0.001$ ), тогда как при введении “Эссенциале” количество ЛФХ снизилось на 18% ( $p < 0.001$ ), а ФК – на 20% ( $p < 0.001$ ). Содержание СМ в мембранах эритроцитов животных при введении обоих препаратов снизилось на 11% ( $p < 0.001$ ), а ФИ – на 40% ( $p < 0.001$ ) при одновременном повышении содержания ФС на 8% ( $p < 0.05$ ). Снизилось также содержание холестерина в среднем на 12% ( $p < 0.001$ ).

Липидный комплекс анфельции был более эффективным стресс-протектором, чем “Эссенциале”. Подтверждением этому является расчет статистической достоверности между соответствующими величинами изученных биохимических показателей в плазме крови и мембранах эритроцитов животных 3-й и 4-й групп. В плазме крови при введении “Эссенциале” содержание общих липидов было выше на 11% ( $p < 0.05$ ), а общих фосфолипидов ниже на 7% по сравнению с их концентрацией при введении липидного комплекса анфельции. Содержание холестерина в плазме крови животных 4-й группы было выше, чем в 3-й группе, на 11% ( $p < 0.05$ ), что обусловило увеличенное на 20% ( $p < 0.01$ ) соотношение холестерин/фосфолипиды. Следует также отметить пониженное содержание ЛПВП (на 14%;  $p < 0.05$ ) по сравнению с таковым в 3-й группе. В мембранах эритроцитов животных 4-й группы содержание ЛФХ и ФК было в среднем на 9% ( $p < 0.05$ ) выше, чем в таковых животных 3-й группы, что свидетельствовало о сохранении повышенной активности фосфолипаз.

## ОБСУЖДЕНИЕ

На основании полученных результатов следует, что в условиях экспериментальной модели стресса происходит нарушение соотношения липидов в крови и формируется дислипидемия. Биохимический механизм увеличения уровня холестерина в плазме крови при стрессе обусловлен активацией липолиза в жировой ткани. При интенсивном окислении жирных кислот на фоне снижения функции цикла Кребса происходит избыточное образование ацетата, являющегося основой для синтеза холестерина (Момот и др., 2016). В результате в крови изменяется содержание липопротеинов: увеличивается концентрация липопротеинов низкой плотности, доставляющих липиды (в основном холестерин) от печени, где они образуются, к клеткам, и снижается содержание липопротеинов высокой плотности, которые выводят холестерин из клеточных мембран в печень. Таким образом, избыточное образование холестерина способствует образованию ЛПНП и, соответственно, в плазме крови регистрируется их высокий уровень. Изменение липидного состава мембран эритроцитов, в частности, увеличение содержания холестерина и лизофракций фосфолипидов, а также одновременное снижение основных структурных фосфолипидов (ФХ и ФЭ) и разбалансировка метаболически активных фракций (ФС, ФИ, ФК) приводят к изменению их физико-химических свойств, проницаемости, лабильности и сложности прохождения по микроциркуляторному руслу. Такие биохимические изменения, возможно, лежат в основе формирования стрессовых заболеваний.

Перспективными корректорами метаболических изменений, возникающих при стрессе, являются природные липидные комплексы морского происхождения, содержащие фосфолипидные фракции и полиненасыщенные жирные кислоты семейства n-3, оказывающие гипохолестеринемическое действие (Новгородцева и др., 2010). Известно, что этерификация холестерина происходит преимущественно с ненасыщенными жирными кислотами (Крылов и др., 1991). Диета с морскими липидами сопровождается встраиванием полиненасыщенных жирных кислот в фосфолипиды мембран и этерификацией холестерина с участием фермента лецитин:холестерин-ацилтрансферазы (ЛХАТ) (Калинкина и др., 1990). Данный биохимический механизм способствует утилизации холестерина из мембран и восстановлению соотношения липопротеинов в сторону увеличения ЛПВП.

При анализе величин отклонений исследованных биохимических параметров в плазме крови и мембранах эритроцитов при введении липидного комплекса анфельции и препарата сравнения “Эссенциале” наиболее значимые эффекты были выявлены у липидного комплекса анфельции. В состав “Эссенциале” (фосфатидилхолин соевых бобов) входят преимущественно линолевая кислота (около 70%), а также линоленовая и олеиновая кислоты. Липидный комплекс анфельции представлен четырьмя видами фосфолипидов (ФХ, ФЭ, ФГ, ФИ), а также жирными кислотами семейств n-3 (линоленовая, эйкозапентаеновая) и n-6 (линолевая, арахидоновая). Присутствие более широкого спектра фосфолипидов и полиненасыщенных жирных кислот обеих семейств, по-видимому, обуславливает более высокую биологическую активность липидного комплекса анфельции по сравнению с таковой препарата “Эссенциале”.

Результаты проведенного исследования позволяют предположить, что применение липидного комплекса анфельции может быть полезным и перспективным при дислипидемии и гиперхолестеринемии, что позволит проводить эффективную профилактику нарушений метаболических реакций при воздействии стрессовых факторов.

## 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. Исследование одобрено Комиссией по вопросам этики Тихоокеанского океанологического института им. В.И. Ильичева ДВО РАН (протокол № 13 от 10.10.2018 г.).

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме № 0271-2019-0004 “Влияние природных и антропогенных факторов на биогеохимические процессы и состояние биоты в морских экосистемах”, государственная регистрация № АААА-А17-117030110038-5.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аминина Н.М. Перспективы использования бурых водорослей для профилактики производственно-обусловленных нарушений состояния здоровья // Здоровье. Мед. экология. Наука. 2017. Т. 5. № 72. С. 38–42.
- Гончарова С.Н., Костецкий Э.Я., Санина Н.М. Влияние сезонных изменений температуры на липидный состав морских макрофитов // Физиол. раст. 2004. Т. 51. № 2. С. 190–196.
- Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н. Иммуноактивные биополимеры из морских гидробионтов. Владивосток: Изд-во ТИНРО-центра. 2007. 219 с.
- Имбс Т.И., Красовская Н.П., Ермакова С.П. и др. Сравнительное исследование химического состава и противоопухолевой активности водно-этанольных экстрактов бурых водорослей *Laminaria sichorioides*, *Costaria costata* и *Fucus evanescens* // Биол. моря. 2009. Т. 35. № 2. С. 140–146.
- Калинкина О.М., Перова Н.В., Зыкова В.П. и др. Влияние диеты, обогащенной  $\omega$ -3 полиненасыщенными жирными кислотами, на функциональную активность тромбоцитов и липидо-аполипопротеиновый спектр крови при впервые возникшей стенокардии // Терапевт. архив. 1990. Т. 62. № 9. С. 77–82.
- Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир. 1975. 221 с.
- Крыжановский С.П., Гельцер Б.И., Запорожец Т.С. и др. Бурые водоросли Тихого океана в лечении и профилактике атеросклероза. Владивосток: Дальнаука. 2016. 152 с.
- Крылов О.Ф., Любимов И.Б., Муляр А.Г. Фармакодинамика эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот // Фармакол. и токсикол. 1991. Т. 54. № 5. С. 67–71.
- Кушнерова Н.Ф., Спрыгин В.Г., Фоменко С.Е., Рахманин Ю.А. Влияние стресса на состояние липидного и углеводного обмена печени, профилактика // Гигиена и санитария. 2005. № 5. С. 17–21.
- Момот Т.В., Кушнерова Н.Ф., Рахманин Ю.А. Профилактика нарушения биохимических показателей в крови крыс при экспериментальном стрессе // Гигиена и санитария. 2016. Т. 95. № 7. С. 678–681.
- Новгородцева Т.П., Эндакова Э.А., Янькова В.И. Руководство по методам исследования параметров системы “Перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита” в биологических жидкостях. Владивосток: Изд-во Дальневост. гос. ун-та. 2003. 80 с.
- Новгородцева Т.П., Караман Ю.К., Бивалькевич Н.В., Жукова Н.В. Использование биологически активной добавки к пище на основе липидов морских гидробионтов в эксперименте на крысах // Вопр. питания. 2010. Т. 79. № 2. С. 24–27.
- Саратиков А.С., Ратькин А.В., Фролов В.Н., Чучалин В.С. Влияние гепатопротекторов фосфолипидной природы на токсичность циклофосфана // Вопр. биол., мед. и фармацевт. химии. 2004. № 2. С. 43–47.
- Спрыгин В.Г., Кушнерова Н.Ф., Фоменко С.Е., Сизова Л.А. Морские водоросли – перспективный источник полифенольных антиоксидантов и комплексов эссенциальных фосфолипидов // Изв. Самар. науч. центра РАН. 2012. Т. 14. № 1. С. 2299–2302.
- Спрыгин В.Г., Кушнерова Н.Ф., Фоменко С.Е. и др. Гепатопротекторные свойства экстракта из бурой водоросли *Saccharina japonica* // Биол. моря. 2013. Т. 39. № 1. С. 50–54.
- Спрыгин В.Г., Кушнерова Н.Ф., Фоменко С.Е. и др. Влияние экстракта из морской бурой водоросли *Sargassum pallidum* (Turner) C. Agardh, 1820 на метаболические реакции печени при экспериментальном токсическом гепатите // Биол. моря. 2017. Т. 43. № 6. С. 444–449.
- Титлянов Э.А., Титлянова Т.В. Морские растения стран Азиатско-Тихоокеанского региона, их использование и культивирование. Владивосток: Дальнаука. 2012. 377 с.
- Фоменко С.Е., Кушнерова Н.Ф., Спрыгин В.Г., Момот Т.В. Антиоксидантные и стресс-протекторные свойства экстракта из морской зеленой водоросли *Ulva lactuca* Linnaeus, 1753 // Биол. моря. 2016. Т. 42. № 6. С. 465–470.
- Хотимченко С.В. Липиды морских водорослей-макрофитов и трав: структура, распределение, анализ. Владивосток: Дальнаука. 2003. 234 с.
- Эндакова Э.А., Новгородцева Т.П., Светашев В.И. Модификация состава жирных кислот крови при сердечнососудистых заболеваниях. Владивосток: Дальнаука. 2002. 296 с.
- Amenta J.S. A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-layer chromatography // J. Lipid Res. 1964. V. 5. № 2. P. 270–272.
- Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. P. 497–509.
- Khotimchenko S.V., Vaskovsky V.E. Distribution of C<sub>20</sub> polyenoic fatty acids in red macrophytic algae // Bot. Mar. 1990. V. 33. № 6. P. 525–528.
- Rouser G., Kritchevsky G., Yamamoto A. Column chromatographic and associated procedures for separation and determination of phosphatides and glycolipids // Lipid Chromatographic Analysis. N.Y.: Dekker. 1967. V. 1. P. 99–162.
- Sanina N.M., Goncharova S.N., Kostetsky E.Y. Fatty acid composition of individual polar lipid classes from marine macrophytes // Phytochemistry. 2004. V. 65. № 6. P. 721–730.
- Sanina N.M., Goncharova S.N., Kostetsky E.Y. Seasonal changes of fatty acid composition and thermotropic behavior of polar lipids from marine macrophytes // Phytochemistry. 2008. V. 69. P. 1517–1527.
- Satoh T., Cohen H.T., Katz A.I. Intracellular signaling in the regulation of renal Na-K-ATPase. II. Role of eicosanoids // J. Clin. Invest. 1993. V. 91. P. 409–415.

- Svetachev V.I., Vaskovsky V.E.* A simplified technique for thin-layer microchromatography of lipids // *J. Chromatogr. A.* 1972. V. 67. № 2. P. 376–378.
- Vaskovsky V.E., Latyshev N.A.* Modified Jungnickel's reagent for detecting phospholipids and other phosphorus compounds on thin-layer chromatograms // *J. Chromatogr. A.* 1975. V. 115. № 1. P. 246–249.
- Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin I.M.* A universal reagent for phospholipid analysis // *J. Chromatogr. A.* 1975. V. 114. № 1. P. 129–141.
- Wagner H., Horhammer L., Wolff P.* Thin layer chromatography of phosphatides and glycolipids // *Biochem. Z.* 1961. Bd. 334. S. 175–184.

## **Effects of the Lipid Complex of Extract from the Marine Red Alga *Ahnfeltia tobuchiensis* (Kanno et Matsubara) Makienko on the Biochemical Parameters of Blood Plasma and Erythrocyte Membranes during Experimental Stress Exposure**

**N. F. Kushnerova<sup>a</sup>, S. E. Fomenko<sup>a</sup>, V. G. Sprygin<sup>a</sup>, and T. V. Momot<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>*V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia*

<sup>b</sup>*Far Eastern Federal University, Vladivostok 690950, Russia*

The present study considers effects of a lipid complex isolated from the aqueous–ethanol (70%) extract from the marine red alga *Ahnfeltia tobuchiensis* and effects of the commercial reference preparation Essentiale on the biochemical parameters of blood plasma and erythrocyte membranes of mice exposed to experimental stress (vertical restraining by the scruff). The pharmacological effect of the lipid complex from *A. tobuchiensis* is manifested as elimination of dyslipidemia and hypercholesterolemia, accompanied by a reduction in levels of total lipids and low-density lipoproteins, an increase in the level of high-density lipoproteins in plasma, and normalization of the cholesterol/phospholipids ratio and the phospholipid composition of erythrocyte membranes. The *Ahnfeltia* extract is not inferior to the Essentiale preparation in terms of effectiveness, and even superior in the potential to restore the blood lipid composition and the phospholipid fraction ratio in erythrocyte membranes. The pharmacological effect of the lipid complex from *Ahnfeltia* is determined by the action of its phospholipid fractions and polyunsaturated n-6 and n-3 fatty acids which contribute to the utilization of cholesterol from membranes, enhancement of the lipoprotein ratio towards increase in high-density lipoproteins, and are also involved in erythrocyte membrane repair.

**Keywords:** *Ahnfeltia tobuchiensis*, stress, blood, erythrocytes, lipoproteins, cholesterol, phospholipids

УДК 582.26:581.4

## МНОГОЛЕТНЯЯ ДИНАМИКА И МОРФОЛОГИЯ ДИАТОМОВОЙ ВОДОРОСЛИ *THALASSIOSIRA NORDENSKIOELDII* CLEVE, 1873 (BACILLARIOPHYTA) В ПРИБРЕЖНЫХ ВОДАХ ЗАЛИВА ПЕТРА ВЕЛИКОГО ЯПОНСКОГО МОРЯ

© 2020 г. О. Г. Шевченко<sup>1,2,\*</sup>, М. А. Шульгина<sup>1</sup>, В. М. Шулькин<sup>3</sup>, К. О. Тевс<sup>4</sup>

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

<sup>2</sup>Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет, Владивосток 690087, Россия

<sup>3</sup>Тихоокеанский институт географии ДВО РАН, Владивосток 690041, Россия

<sup>4</sup>Дальневосточный государственный федеральный университет, Владивосток 690922, Россия

\*e-mail: 713553@mail.ru

Поступила в редакцию 25.06.2019 г.

После доработки 24.10.2019 г.

Принята к публикации 28.11.2019 г.

В результате многолетних исследований видового состава и численности фитопланктона в прибрежных водах зал. Петра Великого Японского моря изучена сезонная и межгодовая динамика обилия диатомовой водоросли *Thalassiosira nordenskioldii* Cleve, 1873. Вид доминировал в планктоне подо льдом зимой и ранней весной при температуре воды от  $-1.8$  до  $0^{\circ}\text{C}$  и при солёности 33.0–35.0‰. В многолетней динамике установлено снижение его роли в сообществе в 2005–2015 гг. по сравнению с 1970-ми годами вплоть до исчезновения из числа доминант зимне-весеннего планктона. Встречаемость клеток *T. nordenskioldii* в районе исследования в течение года и литературные данные свидетельствуют о тропическо-аркто-бореальном типе распределения микроводоросли. Установлена положительная корреляция между солёностью, содержанием органического вещества в воде и численностью *T. nordenskioldii*; отрицательная корреляция с концентрацией нитратов отражала истощение их запаса при массовом развитии этого вида.

**Ключевые слова:** фитопланктон, диатомовые водоросли, *Thalassiosira nordenskioldii*, морфология, многолетняя динамика, экология

DOI: 10.31857/S0134347520040063

Род *Thalassiosira* описан Клеве (Cleve, 1873) из Девисова пролива с определением вида *T. nordenskioldii*. Род был выделен по типу соединения клеток в гибкие цепочки посредством слизистого тяжа. К настоящему времени объединяет более 300 видов и внутривидовых таксонов, большинство из которых являются представителями морского планктона (Guiry, Guiry, 2012). В российских водах Японского моря идентифицирован 31 таксон *Thalassiosira*, среди них вид *T. nordenskioldii* отмечен на всей акватории, а в северо-западной части моря вызывает зимние и ранневесенние “цветения” воды в прибрежной зоне подо льдом или в открытой части (Пономарева, 1954; Зернова, 1980; Макарова, 1988; Шевченко и др., 2003). С декабря по март доля вида может составлять 70–90% от общей численности фитопланктона. В Мировом океане *T. nordenskioldii* являет-

ся одним из наиболее широко распространенных видов планктонных диатомовых водорослей в морях умеренных широт. Вызывает зимние и зимне-весенние “цветения” в водах прибрежной зоны северной Европы и Америки (Karentz, Smayda, 1984; Kristiansen et al., 2001; Smith et al., 2001; Henriksen, 2009). Типичная восьмиугольная форма створки со стороны пояса позволяет идентифицировать вид под световым микроскопом, в том числе и во время рутинных гидробиологических исследований. Простота идентификации, широкое распространение и доминирование среди планктонных микроводорослей обуславливают интерес исследователей к *T. nordenskioldii*. Большинство работ посвящено изучению морфологии вида (Mahood et al., 1986; Tremarin et al., 2008; Li et al., 2013; Park et al., 2016). Сезонная динамика количественных показателей *T. nordenski-*

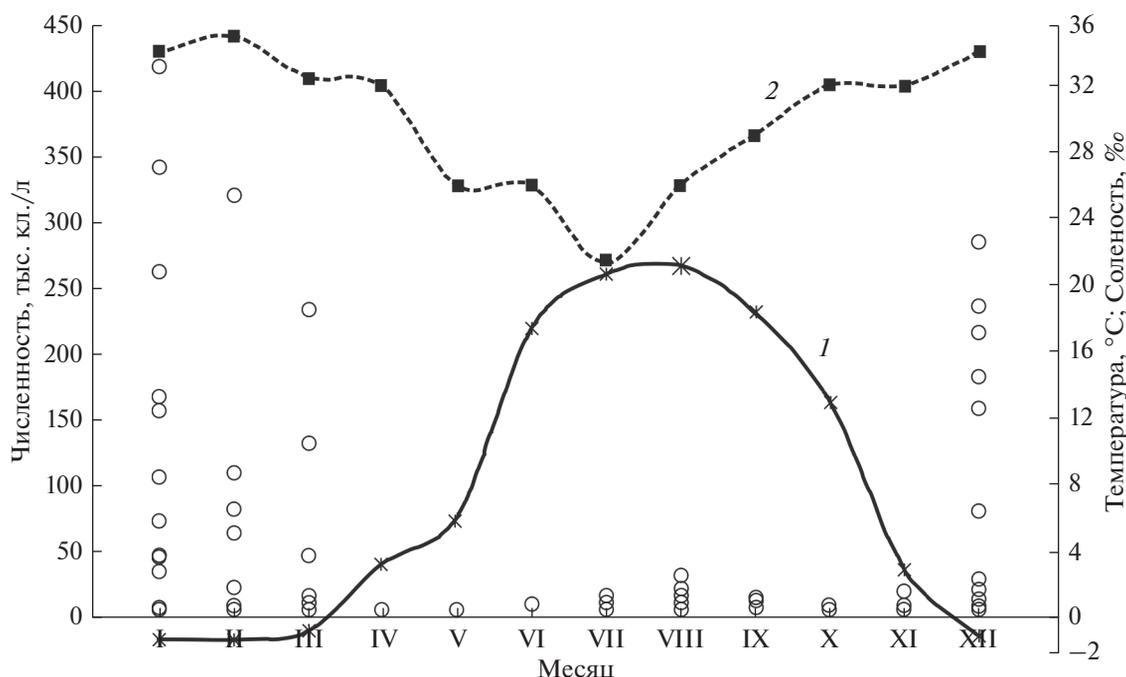


Рис. 1. Численность клеток *Thalassiosira nordenskiöldii* в планктоне (светлые кружки), среднесезонные значения температуры (1) и солености (2) поверхностной воды в районе исследования.

*oeldii* приводится в составе общего фитопланктона; публикации, посвященные многолетним исследованиям динамики вида, единичны (Коновалова, 1987; Smith et al., 2001).

Цель настоящей работы — изучение сезонной и многолетней динамики численности и особенностей экологии *T. nordenskiöldii* в зал. Петра Великого Японского моря.

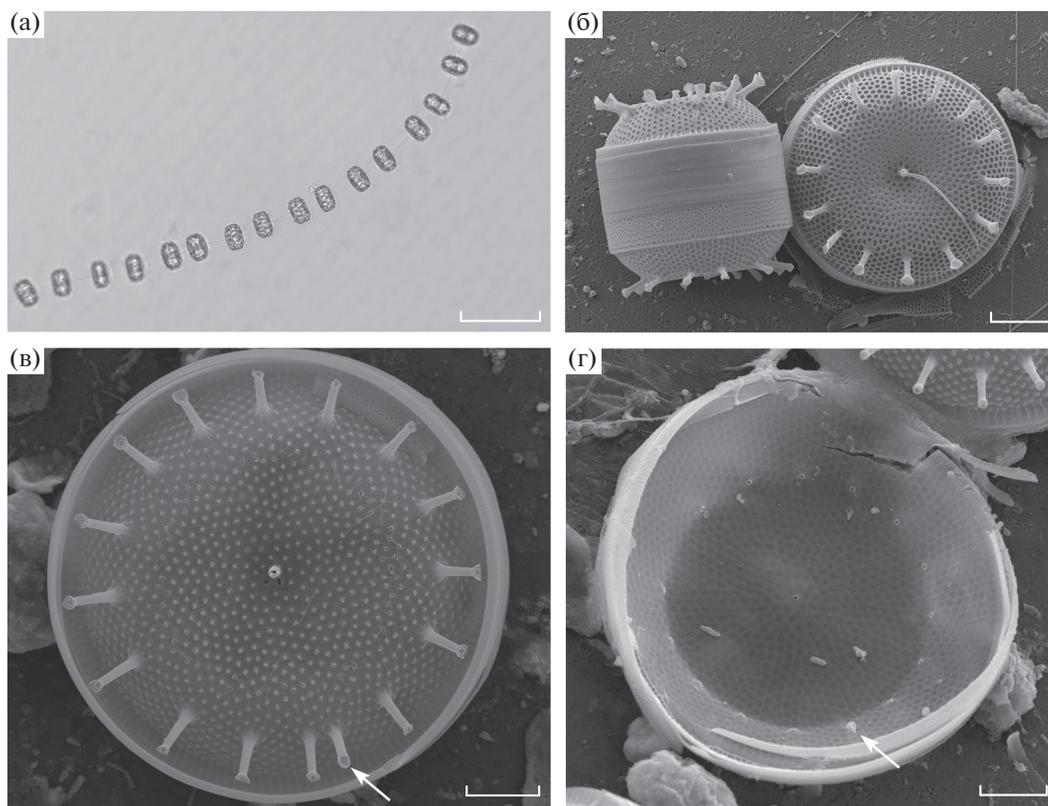
## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Пробы фитопланктона отбирали круглогодично в Амурском заливе (43°11'58" N, 131°54'57" E) с 2005 по 2015 г. и в б. Парис прол. Босфор–Восточный (43°00'44" N, 131°54'45" E) с 2013 по 2015 г. Исследованная акватория характеризуется сильными сезонными колебаниями параметров среды из-за муссонного климата. С апреля по сентябрь преобладают южные и юго-восточные ветры, с октября по март погоду определяют холодные и сухие воздушные массы сибирского антициклона. Смена атмосферной циркуляции в осенний период часто сопровождается локальными апвеллингами в прибрежных водах северо-западной части Японского моря (Юрасов и др., 2007). С глубинными водами к поверхности поступает значительное количество биогенных элементов, что обеспечивает возможность формирования в зал. Петра Великого зон интенсивного развития фитопланктона. По сравнению с Амурским заливом акватория б. Парис испытывает значительное

влияние вод зал. Петра Великого, так как расположена в более открытой его части. В осенне-зимний период происходит значительное охлаждение прибрежных мелководий с образованием в конце ноября ледяного покрова (Юрасов, Вилянская, 2008). Амурский залив и б. Парис с конца декабря до середины марта покрыты льдом толщиной 0.6–1.0 м (Григорьева, 2008). По оригинальным данным средние значения температуры и солености воды в районе исследования варьировали от  $-1.8^{\circ}\text{C}$  и 35.0‰ зимой до  $6.0^{\circ}\text{C}$  и 25.0‰ весной (рис. 1).

Пробы фитопланктона отбирали два раза в месяц 5-литровым батометром Нискина с поверхностного горизонта. Один литр воды фиксировали раствором Утермея, затем концентрировали методом осаждения (Utermöhl, 1958). Численность клеток микроводорослей подсчитывали в счетной камере Нажотта объемом 0.05 мл (Федоров, 1979). Исследования проводили под световым микроскопом (СМ) Olympus BX 41. Тонкую структуру панциря *Thalassiosira nordenskiöldii* изучали под сканирующим электронным микроскопом (СЭМ) Carl Zeiss, Sigma 300. Препараты для СЭМ готовили посредством обезвоживания в этиловом спирте при разных разведениях (Truby, 1997).

“Цветение” водорослей рассматривали как их массовое развитие, при котором плотность клеток вида превышала  $10^6$  кл/л (Colijn, 1992). Доминирующим считали вид, численность которого



**Рис. 2.** *Thalassiosira nordenskiöldii*. а – клетки объединены в колонию, в каждой клетке многочисленные хлоропласты; б – общий вид клетки со стороны пояска (восьмиугольная форма) и со стороны створки (округлая форма); в – створка с краевыми выростами с опорами, стрелкой указан двугубый вырост; г – створка изнутри, стрелкой указан двугубый вырост. а – СМ, б–г – СЭМ. Масштаб: а – 40, б–г – 5 мкм.

составляла не менее 20% от общей численности всех видов в сообществе (Коновалова, 1984).

Одновременно с отбором проб микроводорослей отбирали воду для гидрохимических исследований в полиэтиленовые емкости с глубины 0.3–0.5 м. Воду фильтровали через капсульные фильтры Pall GWV с размером пор 0.45 мкм с последующим определением в фильтрах концентрации биогенных веществ (N, P, Si). Нефильтрованную аликвоту пробы использовали для кондуктометрического определения солености на приборе YSI, а также для оценки химического потребления кислорода (ХПК), которое отражает содержание органических веществ (COD), окисляемых  $\text{KMnO}_4$  в  $\text{H}_2\text{SO}_4$  по Скопинцеву (Шишкина, 1974). Кроме этого 2 л пробы фильтровали через предварительно взвешенный мембранный фильтр Millipore с размером пор 0.45 мкм для определения содержания в воде взвеси (SS).

Концентрацию нитритов, нитратов, их суммы (DIN), фосфатов (DIP) и растворенных силикатов (DSi) определяли стандартными спектрофотометрическими методами (РД 52.10.738–2010; РД 52.10.745–2010; РД 52.10.744–2010), совпадающими с международными (Methods..., 1983). Рас-

творенные органические формы фосфора (DOP) определяли как фосфаты после окисления фильтрованных проб воды кипячением с персульфатом К (РД 52.10.739–2010).

Статистическую оценку различий сезонного распределения гидрохимических параметров среды и количественных характеристик фитопланктона проводили с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни в среде Minitab Statistical Software 14. Различие считали значимым при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В 2005–2015 гг. в фитопланктоне прибрежных вод зал. Петра Великого Японского моря отмечено круглогодичное присутствие диатомовой водоросли *Thalassiosira nordenskiöldii*. На основании данных световой и электронной микроскопии составлено описание вида (рис. 2).

**СМ.** Клетки собраны с помощью тонкого центрального тяжа в колонию до 32 клеток. Панцирь со стороны створки округлой формы, 15–37 мкм в диаметре, со стороны пояска восьмиугольной

формы, 10–21 мкм шириной. Хлоропласты мелкие, многочисленные (рис. 2а).

**СЭМ.** Створки выпуклые, в центре с углублением, в котором размещен один крупный вырост. Ареолы расположены в радиальных рядах, 14–20 в 10 мкм; форамены ареол округлой формы (рис. 2б). В центре створки вырост окружен ареолами большего размера. Загиб створки высокий, с ареолами в вертикальных рядах. На загибе створки кольцо краевых выростов с опорами (2–4 в 10 мкм), направленных от центра к периферии (рис. 2б, 2в). На лицевой части створки краевые выросты в виде длинной трубки, окаймленной воронкой в дистальной части. Двугубый вырост расположен в кольце краевых выростов; на лицевой части створки в виде трубки, по размерам схожей с краевыми выростами, без воронки (рис. 2в). С внутренней стороны створки двугубый вырост ориентирован радиально (рис. 2г).

Изучение обилия фитопланктона показало, что интенсивная вегетация *T. nordenskioldii* происходила подо льдом при температуре поверхностного слоя воды от  $-1.8$  до  $0^{\circ}\text{C}$  и при солёности 33.0–35.0‰; в теплый сезон колонии наблюдали в планктоне редко (рис. 1). В зимне-весенний период 2005–2010 гг. доля клеток *T. nordenskioldii* достигала 94% в сообществе в Амурском заливе и 98% в б. Парис. В летний период доля микроводоросли не превышала 2%.

В Амурском заливе динамика численности *T. nordenskioldii* характеризовалась одним или двумя пиками. Максимум обилия (412.8 тыс. кл/л) зарегистрирован в конце января 2010 г. С декабря 2010 г. плотность *T. nordenskioldii* в Амурском заливе не превышала 50 тыс. кл/л во время однократных зимних пиков (рис. 3а). С 2013 г. вид не доминировал в фитопланктоне залива. В б. Парис для этого же периода отмечали следующую динамику численности: 2013 г. – плотность микроводоросли не превышала 20 тыс. кл/л, 2014 г. – вид определял весеннее “цветение” фитопланктона, 2015 г. – вид отсутствовал в планктоне бухты (рис. 3б). На протяжении всего периода исследования “цветение” воды, обусловленное развитием *T. nordenskioldii*, отмечали однократно в марте 2014 г. в б. Парис; плотность вида составляла 1490.7 тыс. кл/л (рис. 3).

Анализ корреляции между количественными показателями обилия *T. nordenskioldii* и гидрохимическими условиями среды выявил наличие положительной связи между численностью вида и солёностью поверхностного слоя воды ( $p = 0.026$ ), а также с количеством COD, оцененным по величине ХПК ( $p = 0.009$ ). Отмечена также отрицательная корреляция между численностью микроводоросли и DIN ( $p = 0.009$ ) (рис. 4). Корреляция между обилием *T. nordenskioldii*, температурой воды,

концентрацией биогенных элементов (Si, DIP, DOP) и взвешенных частиц SS отсутствовала.

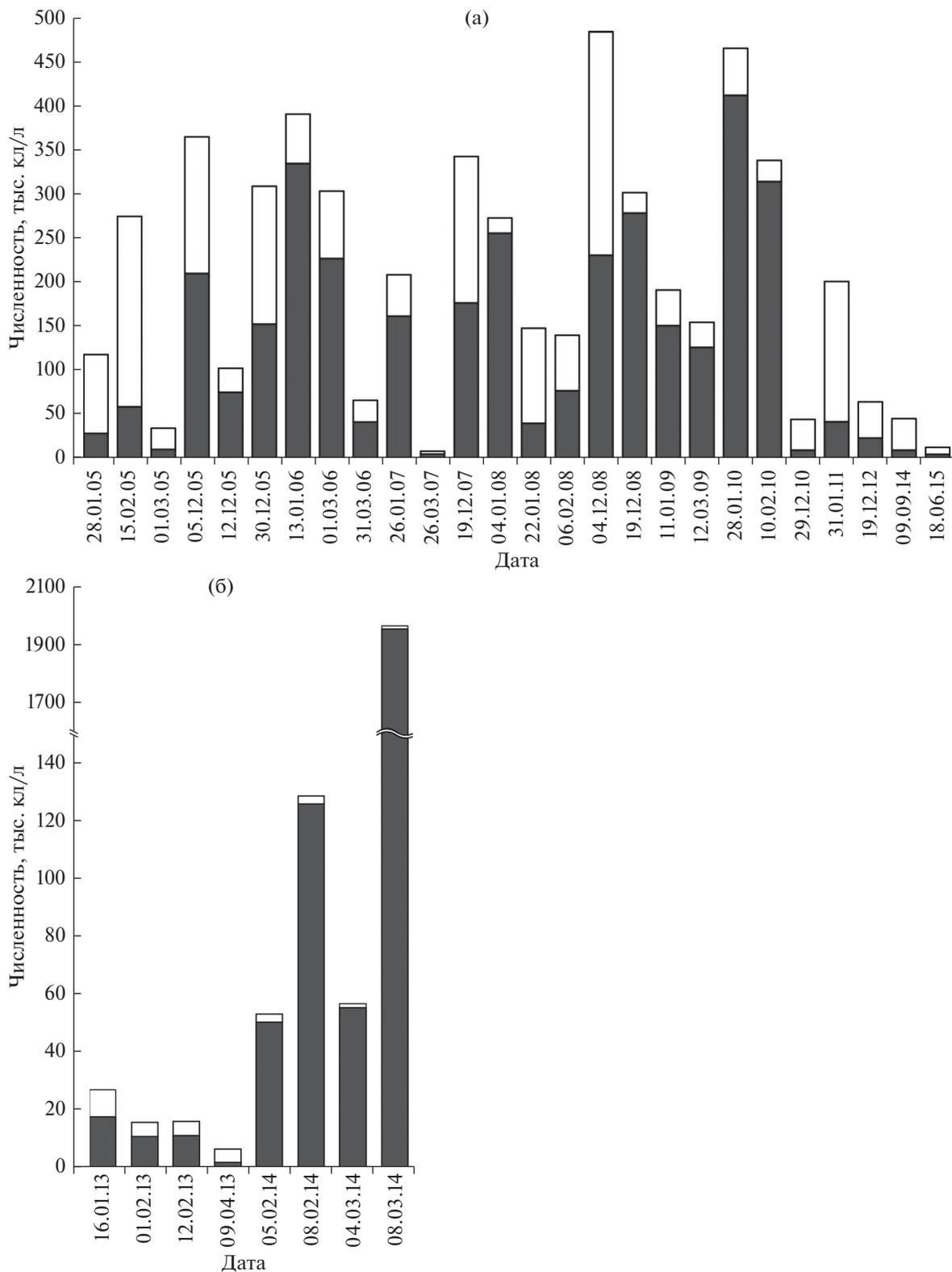
## ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных данных показал, что морфология клеток *Thalassiosira nordenskioldii* в районе исследования соответствует оригинальному описанию (Cleve, 1873) и согласуется с данными других исследователей (Mahood et al., 1986; Макарова, 1988; Li et al., 2013).

По литературным сведениям *T. nordenskioldii* является холодноводным аркто-бореальным видом (Макарова, 1988). Однако обнаружение микроводоросли у берегов Южной Кореи и юго-восточной Бразилии, в Желтом, Восточно-Китайском и Южно-Китайском морях ( $21^{\circ}$ – $25^{\circ}$  N) (Tremarin et al., 2008; Li et al., 2013; Park et al., 2016), а также в летний период в районе исследования в Японском море указывает на тропическо-аркто-бореальный тип распространения вида, согласно отечественной системе фитогеографического районирования (Беклемишев и др., 1977). Вегетация *T. nordenskioldii* в широком диапазоне температур подтверждает расширение границ его ареала. Так, в природных популяциях оптимум развития вида по нашим данным приходится на температуру воды  $-1.8$ – $0^{\circ}\text{C}$ , а по литературным сведениям на  $-1.7$ – $6^{\circ}\text{C}$  (Degerlund, Eilertsen, 2010), хотя известно, что в лабораторной культуре интенсивное развитие микроводоросли происходит при температуре до  $18^{\circ}\text{C}$  (Durbin, 1974; наши данные).

В зал. Петра Великого Японского моря *T. nordenskioldii* наиболее обилён в зимне-весенний период, что обусловлено характерными для этого времени года высокой солёностью воды и низкой температурой, благоприятными для развития микроводоросли. Корреляционные связи численности *T. nordenskioldii* с гидрохимическими параметрами среды отражают приуроченность массового развития микроводоросли к зимнему периоду, когда солёность вод наибольшая. Сходную корреляцию между солёностью воды и развитием *T. nordenskioldii* наблюдали в период “цветения” фитопланктона в водах северо-восточной Атлантики и Арктики ( $68^{\circ}$ – $80^{\circ}$  N) (Degerlund, Eilertsen, 2010). Температура воды является фактором, благоприятным для массового развития вида в зимне-весенний период, но не лимитирующим.

В начале зимы для вод района исследования характерны высокие показатели биогенных элементов (Шулькин и др., 2013; Shevchenko et al., 2018). Их уровень не служит фактором, лимитирующим численность *T. nordenskioldii* ни в районе исследования, ни в морях умеренной зоны Мирового океана (Degerlund, Eilertsen, 2010;



**Рис. 3.** Даты доминирования *Thalassiosira nordenskioldii* в фитопланктоне Амурского залива (а) и б. Парис (б). Черные столбики – численность *T. nordenskioldii*; белые столбики – численность клеток других видов сообщества.

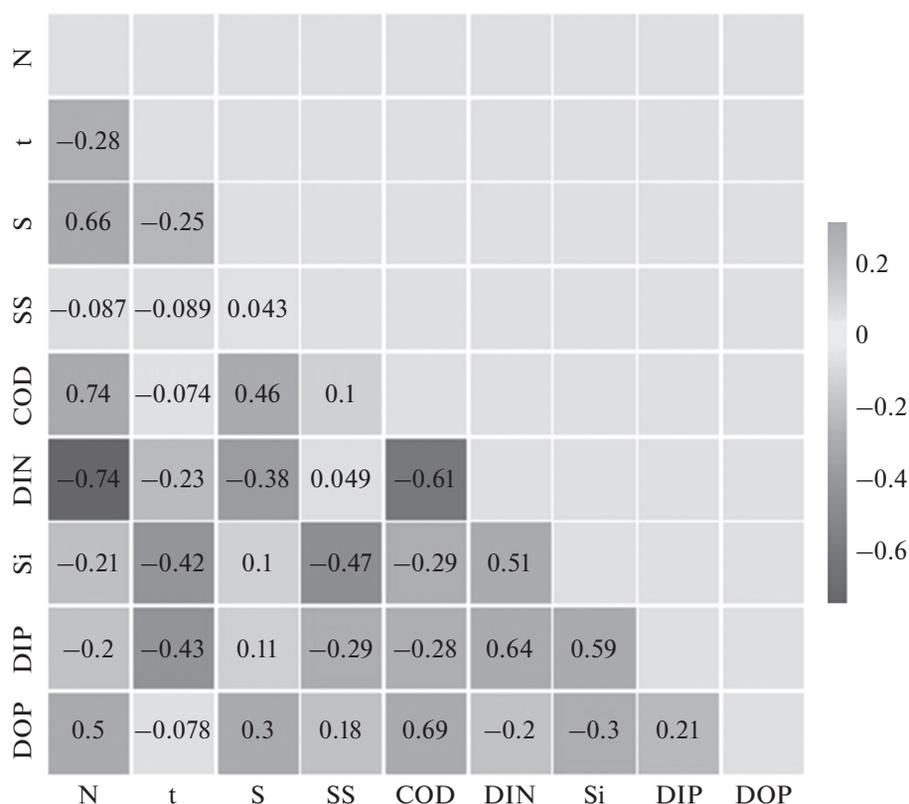


Рис. 4. Корреляционная матрица численности *Thalassiosira nordenskiöldii* и параметров среды в районе исследования в 2013–2015 гг.

Flickinger, 2016). Наблюдали прямое влияние вегетации *T. nordenskiöldii* на содержание органического вещества в воде. Показатель ХПК отражает содержание органического вещества в воде, поступающего в прибрежную зону моря со стоком с суши, а также синтезированного фитопланктоном. Поскольку максимумы численности *T. nordenskiöldii* регистрируются преимущественно зимой, когда береговой сток незначительный, доминирующая роль фитопланктона в динамике ХПК наиболее вероятна. Обратная связь обилия микроводоросли с концентрацией нитратов, возможно, отражает истощение запаса нитратов при ее массовом развитии в зимний период.

С 1970-х годов *T. nordenskiöldii* известен как вид, вызывающий “цветение” воды в зимне-весенний период в умеренных водах Мирового океана (Cleve, 1873; Smayda, 1957; Degerlund, Eilertsen, 2010). Уменьшение роли *T. nordenskiöldii* в сообществе в 2000-х годах по сравнению с таковой в 1970-х годах прошлого века и в более ранний период отмечено в ряде исследований (Degerlund, Eilertsen, 2010; Flickinger, 2016). В некоторых районах, например, в зал. Наррагансетт (Атлантический океан, США), с 2014 г. зарегистрировано полное исчезновение вида (Flickinger, 2016). В северо-западной части Японского моря

зимнее “цветение” микроводоросли (плотность более 2.5 млн кл/л) наблюдали в 1950–70-х годах (Пономарева, 1954; Зернова, 1980; Коновалова, 1987). По нашим данным в многолетней динамике численности *T. nordenskiöldii* в Амурском заливе после 2010 г. все реже стали проявляться пики развития. Только в б. Парис, расположенной в сравнительно открытой части зал. Петра Великого, в марте 2014 г. регистрировали “цветение” воды, обусловленное массовым развитием этой микроводоросли.

Многолетние круглогодичные наблюдения в зал. Петра Великого свидетельствуют о том, что с конца 2010 г. вид *T. nordenskiöldii*, бывший еще в начале 2000-х годов одним из доминирующих видов зимне-весеннего сообщества в исследуемом районе Японского моря, утратил преобладающую роль, а с 2015 г. выпал из состава фитопланктона. Согласно полученным данным, развитие микроводоросли не лимитировали соленость и температура. Не отмечено корреляции между обилием микроводоросли и биогенными элементами, за исключением азота, снижение концентрации которого, возможно, было обусловлено ее массовым развитием. Изменения в составе традиционных для акватории видов-доминант на быстрорастущие виды-оппортунисты — это, по-видимому,

тенденция, связанная с глобальными процессами в Мировом океане (резкие колебания климата, acidification океана) (Cloern, Dufford, 2005; Litchman et al., 2007). На исследованной акватории в Амурском заливе и б. Парис в марте 2013 г. впервые зарегистрировано “цветение” воды, обусловленное новым для науки видом гаптофитовой водоросли *Pseudohaptolina sorokinii* (Orlova et al., 2016; Пономарева, Шевченко, 2016), тогда как численность *T. nordenskioldii* была сравнительно невысокой. Вместе с тем не исключена многолетняя изменчивость межгодовой динамики численности *T. nordenskioldii*, изучить которую можно только на основании более долговременных наблюдений.

### 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 Центре коллективного пользования “Приморский океанариум” ННЦМБ ДВО РАН (г. Владивосток) при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 19-04-00752.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Беклемишев К.В., Парин Н.В., Семин И.В. Пелагиаль // Океанология. Биология океана. Биологическая структура океана. М.: Наука. 1977. Т. I. С. 219–262.
- Григорьева Н.И. Геоморфологические и гидрометеорологические характеристики северной части Амурского залива (основанные на данных 1960–1980 гг. и 2000–2005 гг.) // Экологические исследования и состояние экосистемы Амурского залива и эстуарной зоны реки Раздольной (Японское море). Владивосток: Дальнаука. 2008. Т. I. С. 44–60.
- Зернова В.В. Некоторые закономерности распределения фитопланктона в Японском море и прилегающих районах Тихого океана // Исследования планктона Японского моря. М.: ИО АН СССР. 1980. С. 15–29.
- Коновалова Г.В. Структура планктонного фитоценоза залива Восток Японского моря // Биол. моря. 1984. № 1. С. 13–23.
- Коновалова Г.В. Морфология и экология доминирующей планктонной диатомеи Японского моря *Thalassiosira nordenskioldii* Cl. // Тр. ЗИН АН СССР. 1987. Т. 172. С. 39–45.
- Макарова И.В. Диатомовые водоросли морей СССР: род *Thalassiosira* Cl. Л.: Наука. 1988. 117 с.
- Пономарева Л.А. Зимний зоопланктон северной части Японского моря зимой // Тр. ИО АН СССР. 1954. Т. 9. С. 159–172.
- Пономарева А.А., Шевченко О.Г. Цветение гаптофитовой водоросли в районе содержания морских млекопитающих на открытой воде // Вода: химия, экология. 2016. № 12. С. 54–58.
- РД 52.10.738–2010. Массовая концентрация фосфатов в морских водах. Росгидромет. М. 2010. 28 с.
- РД 52.10.739–2010. Массовая концентрация общего фосфора в морских водах. Росгидромет. М. 2010. 29 с.
- РД 52.10.744–2010. Массовая концентрация кремния в морской воде. Росгидромет. М. 2010. 14 с.
- РД 52.10.745–2010. Массовая концентрация азота нитратного в морской воде. Росгидромет. М. 2010. 27 с.
- Федоров В.Д. О методах изучения фитопланктона и его активности. М.: МГУ. 1979. 167 с.
- Шевченко О.Г., Орлова Т.Ю., Стоник И.В. Новые для дальневосточных морей России виды *Thalassiosira* (Bacillariophyta) // Бот. журн. 2003. Т. 88. № 5. С. 152–155.
- Шишкина Л.А. Гидрохимия. Л.: Гидрометеиздат. 1974. 287 с.
- Шулькин В.М., Орлова Т.Ю., Шевченко О.Г., Стоник И.В. Влияние речного стока и продукции фитопланктона на сезонную изменчивость химического состава прибрежных вод Амурского залива Японского моря // Биол. моря. 2013. Т. 39. № 3. С. 202–212.
- Юрасов Г.И., Ванин Н.С., Рудых Н.И. Особенности гидрологического режима зал. Петра Великого в осенне-зимний период // Изв. ТИНРО. 2007. Т. 148. С. 211–220.
- Юрасов Г.И., Вилянская Е.А. Характерные особенности осенне-зимнего апвеллинга в заливе Петра Великого // Современное состояние и тенденции изменения природной среды залива Петра Великого Японского моря. М.: ГЕОС. 2008. С. 73–82.
- Cleve P.T. On diatoms from the Arctic Sea // K. Sven. Vetenskapsakad. Handl. 1873. V. 1. № 13. P. 1–28.
- Cloern J.E., Dufford R. Phytoplankton community ecology: principles applied in San Francisco Bay // Mar. Ecol.: Prog. Ser. 2005. V. 285. P. 11–28.
- Colijn F. Changes in plankton communities: when, where and why // ICES Mar. Sci. Symp. 1992. V. 195. P. 193–212.
- Degerlund M., Eilertsen H.C. Main species characteristics of phytoplankton spring blooms in NE Atlantic and Arctic waters (68–80° N) // Estuaries Coasts. 2010. V. 33. P. 242–269.
- Durbin E.G. Studies on the autecology of the marine diatom *Thalassiosira nordenskioldii* Cleve. The influence of daylength, light intensity, and temperature on growth // J. Phycol. 1974. V. 10. P. 220–225.
- Flickinger S. *Thalassiosira* community composition and diversity in Narragansett Bay: Master’s thesis. Univ. of Rhode Island. 2016. 77 p.
- Guiry M.D., Guiry G.M. 2012. Algaebase. <http://www.algaebase.org>. Accessed 13 March 2019.
- Henriksen P. Long-term changes in phytoplankton in the Kattegat, the Belt Sea, the Sound and the western Baltic Sea // J. Sea Res. 2009. V. 61. P. 114–123.

- Karentz D., Smayda T.J. Temperature and seasonal occurrence patterns of 30 dominant phytoplankton species in Narragansett Bay over a 22-year period (1959–1980) // *Mar. Ecol.: Prog. Ser.* 1984. V. 18. P. 277–293.
- Kristiansen S., Farbrodt T., Naustvoll L.-J. Spring bloom nutrient dynamics in the Oslofjord // *Mar. Ecol.: Prog. Ser.* 2001. V. 219. P. 41–49.
- Li Y., Zhao Q., Lü S. The genus *Thalassiosira* off the Guangdong coast, South China Sea // *Bot. Mar.* 2013. V. 56. № 1. P. 83–110.
- Litchman E., Klausmeier C.A., Schofield O.M., Falkowski P.G. The role of functional traits and trade-offs in structuring phytoplankton communities: scaling from cellular to ecosystem level // *Ecol. Lett.* 2007. V. 10. P. 1170–1181.
- Mahood A.D., Fryxell G.A., McMillan M. The diatom genus *Thalassiosira*: species from the San Francisco Bay system // *Proc. Calif. Acad. Sci.* 1986. V. 44. № 8. P. 127–156.
- Methods of seawater analysis / Eds K. Grasshoff, M. Erhardt, K. Kremling. Weinheim: Verlag Chemie. 1983. 419 p.
- Orlova T.Y., Efimova K.V., Stonik I.V. Morphology and molecular phylogeny of *Pseudohaptolina sorokinii* sp. nov. (Prymnesiales, Haptophyta) from the Sea of Japan, Russia // *Phycologia*. 2016. V. 55. № 5. P. 506–514.
- Park J.S., Jung S.W., Lee S.D. et al. Species diversity of the genus *Thalassiosira* (Thalassiosirales, Bacillariophyta) in South Korea and its biogeographical distribution in the world // *Phycologia*. 2016. V. 55. № 4. P. 403–423.
- Shevchenko O.G., Shulkin V.M., Ponomareva A.A. Phytoplankton and hydrochemical parameters near net pens with beluga whales in a shallow bay of the northwestern Sea of Japan // *Thalassas*. 2018. V. 34. P. 139–151.
- Smayda T.J. Phytoplankton studies in lower Narragansett Bay // *Limnol. Oceanogr.* 1957. V. 2. P. 342–359.
- Smith A.C., Martin J.L., Ehrman J.M., Kaczmarek I. Ten-year record of *Thalassiosira nordenskiöldii* population dynamics: comparison of aquaculture and non-aquaculture sites in the Quoddy Region // *ICES J. Mar. Sci.* 2001. V. 58. P. 391–397.
- Tremarin P.I., Ludwig T.A.V., Filho H.M. Thalassiosirales (Diatomeae) do rio Guaraguaçu, Bacia Litorânea, PR, Brasil // *Acta Bot. Bras.* 2008. V. 22. № 4. P. 1101–1113.
- Truby E.W. Preparation of single-celled marine dinoflagellates for electron microscopy // *Microsc. Res. Tech.* 1997. V. 36. P. 337–340.
- Utermöhl H. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik // *Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. Mitt.* 1958. V. 9. P. 1–38.

## Long-Term Dynamics and Morphology of the Diatom *Thalassiosira nordenskiöldii* Cleve, 1873 (Bacillariophyta) from the Coastal Waters of Peter the Great Bay, Sea of Japan

O. G. Shevchenko<sup>a, b</sup>, M. A. Shulgina<sup>a</sup>, V. M. Shulkin<sup>c</sup>, and K. O. Tevs<sup>d</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>Far Eastern State Technical Fisheries University, Vladivostok 690087, Russia

<sup>c</sup>Pacific Geographical Institute, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

<sup>d</sup>Far Eastern Federal University, Vladivostok 690922, Russia

The long-term study of the species composition and numbers of phytoplankton in the coastal waters of Peter the Great Bay, the Sea of Japan, revealed seasonal and year-to-year dynamics in the abundance of the diatom *Thalassiosira nordenskiöldii* Cleve, 1873. The species dominated the phytoplankton in winter and early spring, growing under the sea ice at a surface water temperature of  $-1.8$  to  $0^{\circ}\text{C}$  and a salinity of 33.0–35.0‰. The observations of long-term population dynamics of *T. nordenskiöldii* (2005–2015) showed a decline in its significance in the phytoplankton community, as compared to the 1970s, resulting in a complete loss of dominance in winter–spring plankton assemblages. The year-round occurrence of *T. nordenskiöldii* cells in the studied area, as well as data from the literature, indicate that the species has a tropical–arctic–boreal distribution. Positive correlations were found between the surface water salinity, the content of organic matter in seawater, and the abundance of *T. nordenskiöldii*. A negative relationship with nitrate concentration reflected a depletion of nitrates caused by the mass growth of *T. nordenskiöldii*.

**Keywords:** phytoplankton, diatoms, Bacillariophyta, *Thalassiosira nordenskiöldii*, morphology, long-term dynamics, ecology

УДК 615.468:604.4-7

## ГИДРОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ ИЗ МОРСКИХ ОРГАНИЗМОВ КАК ИНГИБИТОРЫ ОБРАЗОВАНИЯ БИОПЛЕНОК

© 2020 г. Н. А. Терентьева<sup>1, \*</sup>, Н. С. Буйновская<sup>1</sup>, Ю. А. Носкова<sup>1</sup>, Л. В. Слепченко<sup>1, 2</sup>,  
О. И. Недашкова<sup>1</sup>, Л. А. Текутьева<sup>2</sup>, Л. А. Балабанова<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,  
Владивосток 690022, Россия

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

\*e-mail: nattere@mail.ru

Поступила в редакцию 29.11.2019 г.

После доработки 28.01.2020 г.

Принята к публикации 30.01.2020 г.

Изучено влияние гидролитических ферментов из морских источников на образование и разрушение бактериальных биопленок. Установлено, что рост биопленок разных видов морских бактерий стимулировался в присутствии  $\alpha$ -D-галактозидазы морской бактерии *Pseudoalteromonas* sp. КММ 701, тогда как формирование биопленок бактерий *Bacillus subtilis* и *Yersinia pseudotuberculosis* ингибировалось этим ферментом. Обработка зрелых биопленок  $\alpha$ -галактозидазой приводила к разрушению от 5 до 35% биопленки у разных видов бактерий. Фосфодиэстераза и щелочная фосфатаза морской бактерии *Cobetia amphilecti* КММ 296 оказывали ингибирующее действие на биопленки морских штаммов *Bacillus licheniformis*, *B. aegricola* и *B. berkeleji*, а также диспергировали уже сформированные биопленки этих бацилл и иерсинии. ДНКазы гепатопанкреаса краба ингибировала образование биопленки у *Y. pseudotuberculosis* и *B. subtilis*, частично разрушая зрелую биопленку.

**Ключевые слова:** биопленка, ингибиторы, морские микроорганизмы, ферменты

**DOI:** 10.31857/S0134347520040099

Большинство видов бактерий существует в природе в виде специфически организованных биопленок (biofilms). Бактериальная биопленка — это сообщество одного или нескольких видов бактерий, прикрепленных к поверхности или друг к другу и заключенных в матрикс из синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ (Costerton et al., 1999; Романова, Гинцбург, 2011). В состав внеклеточного матрикса биопленки входят экзополисахариды, белки, нуклеиновые кислоты и другие вещества (Flemming, Wingender, 2010). Биопленка защищает бактерии от неблагоприятных абиотических факторов внешней среды, а также от факторов специфической и неспецифической защиты иммунной системы хозяина. Бактерии в биопленке могут “общаться” между собой посредством секреторных интермедиаторов, которые служат основой их “социального” поведения, или “quorum sensing” (Lazar, 2011). Исследование биопленок вызывает огромный интерес, поскольку микроорганизмы способны образовывать биопленки на любых биотических и абиотических поверхностях. В медицине проблема связана с образованием биопленок на протезах, катетерах, шунтах и контактных линзах

(Романова, Гинцбург, 2011). Особое внимание уделяется изучению образования биопленки патогенными бактериями, поскольку причиной многих хронических инфекций являются микроорганизмы, растущие в виде биопленок (Römling, Balsalobre, 2012). Устойчивость к антибиотикам у бактерий в биопленке в 1000 раз больше, чем у планктонных форм (Costerton et al., 1999; Романова, Гинцбург, 2011).

Для ингибирования образования бактериальной биопленки и ее разрушения могут быть использованы низкомолекулярные вещества, или ферменты (Fleming, Rumbaugh, 2017). В связи с этим целью настоящей работы являлось изучение действия некоторых гидролитических ферментов из морских источников на формирование и разрушение биопленки, образованной разными видами микроорганизмов, в том числе обитателями моря.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали штаммы *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. aegricola* и *B. berkeleji* из коллекции ФГБУН ТИБОХ ДВО РАН и клинический

**Таблица 1.** Влияние ферментов на формирование (1) и разрушение (2) биопленки (в %)

Штамм микроорганизма	Фермент					
	фосфодиэстераза (0.1 ед./мл)		щелочная фосфатаза (1.75 ед./мл)		α-галактозидаза (0.5 ед./мл)	
	1	2	1	2	1	2
<i>Bacillus subtilis</i>	100 ± 6	0	100 ± 5	0	78 ± 4	28 ± 1
<i>B. licheniformis</i>	74 ± 4	15 ± 2	57 ± 3	35 ± 2	125 ± 7	35 ± 2
<i>B. aegricola</i>	68 ± 4	14 ± 2	49 ± 3	7 ± 1	128 ± 6	10 ± 1
<i>B. berkelegi</i>	82 ± 5	8 ± 1	66 ± 4	3 ± 1	130 ± 7	5 ± 1
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	85 ± 5	23 ± 3	80 ± 4	27 ± 2	69 ± 4	27 ± 2
Контроль	100 ± 5	0	100 ± 5	0	100 ± 6	0

Примечание. Приведена средняя величина ± стандартное отклонение; 0 – разрушение сформированной биопленки отсутствовало.

штамм *Yersinia pseudotuberculosis* 512pYV+ из коллекции ФГБУ НИИЭМ. Применяли метод, основанный на способности бактерий формировать биопленки на полистероловых 96-луночных планшетах и на окрашивании биопленок кристалл виолетом (O'Toole, 2011), что позволяет быстро определять количество образованных микроорганизмами биопленок в разных условиях культивирования, а также исследовать влияние на этот процесс различных агентов (Nijland et al., 2010).

Изучали действие на биопленки разных концентраций ДНКазы (КФ 3.1.21.1) из гепатопанкреаса краба (Мензорова и др., 1994), α-галактозидазы (КФ 3.2.1.22) морской бактерии *Pseudoalteromonas* sp. КММ 701 (Патент РФ № 2012142209/10), фосфодиэстеразы (КФ 3.1.4.1) морской бактерии *Cobetia amphilecti* КММ 296 (Noskova et al., 2018) и щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1) морской бактерии *C. amphilecti* КММ 296 (ранее *Cobetia marina* КММ 296) (Голотин и др., 2015). Все эксперименты проводили в 4–8 повторностях. Контролем служила среда с микроорганизмами без добавления ферментов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что основную часть внеклеточного матрикса биопленки составляют полисахариды, состав которых у разных бактерий различается (Flemming, Wingender, 2010). Экзополисахариды помогают бактериям выживать в морской среде, а также являются факторами, способствующими их проникновению в организм человека в период сезонных эпидемий. В связи с этим весьма актуальным является изучение влияния гликозидаз на формирование биопленок морских бактерий, участвующих в трансформации углеводов и углеводсодержащих биополимеров.

Мы изучали влияние рекомбинантного белка α-галактозидазы морской бактерии *Pseudoalteromonas* sp. штамма КММ 701 на формирование биопленки разными штаммами микроорганизмов. Этот фермент катализирует гидролиз α-галактозидной связи в олигосахаридах (раффиноза, мелибиоза, стахиоза), в полисахаридах (галактоманнаны), а также в гликоконъюгатах, включая гликопротеины и гликолипиды (Патент РФ № 201214222012).

Исследование роста биопленок морских видов из рода *Bacillus* показало, что в течение трех суток при комнатной температуре α-галактозидаза (0.5 ед./мл) вызывала небольшое увеличение количества биопленок морских бактерий, тогда как формирование биопленки *B. subtilis* ингибировалось на ~20% (табл. 1). Ингибирование наблюдалось и при образовании биопленки *Y. pseudotuberculosis*. Микроорганизмы рода *Yersinia* относятся к возбудителям сапрозоонозов, обладающих сапрофитной и паразитической природой. Они способны существовать как в организме человека и животных, вызывая инфекционный процесс, так и в объектах окружающей среды (Сомов, 2004). Бактерии рода *Yersinia* обнаружены также в морской воде и гидробионтах (морские ежи, голотурии, трепанг) (Кузнецов и др., 2006).

Можно предположить, что α-галактозидаза в природном штамме *Pseudoalteromonas* sp. КММ 701 наряду с другими механизмами может участвовать в процессе формирования биопленки, поскольку данные бактерии часто оказываются в экстремальных условиях выживания. Кроме этого, морские бактерии занимают определенную нишу в симбиотическом сообществе и помогают выживать другим участникам сообщества – бактериям, водорослям и животным. Не исключено, что в определенной мере воздействие фермента на формирование структуры биопленки связано со способностью α-галактозидазы к трансгликози-

лированию – переносу галактозной группы на другие субстраты (олиго- и полисахариды) (Слепченко и др., 2017; Bakunina et al., 2018).

$\alpha$ -Галактозидаза может также разрушать зрелую биопленку. Обработка биопленки ферментом приводила к разрушению от 5 до 35% биопленки у разных видов бактерий. Ранее было установлено, что  $\alpha$ -галактозидаза из морской бактерии *Pseudoalteromonas* sp. КММ 701 способна редуцировать такой важнейший фактор пленкообразования, как адгезия, у патогенного микрорганализма *Corinebacterium diphtheriae*, колонизирующего слизистый эпителий человека (Balabanova et al., 2010), и значительно изменять морфологию внеклеточного матрикса биопленки *Pseudomonas aeruginosa* (см.: Слепченко и др., 2017).

Бифункциональная щелочная фосфодиэстераза морской бактерии *C. amphilecti* КММ 296 (0.1 ед./мл) с активностью щелочной фосфатазы, принадлежащая к структурному семейству фосфатаз/фосфодиэстераз, оказывала небольшое ингибирующее действие на биопленки морских бацилл *B. licheniformis*, *B. aegricola* и *B. berkelegi* (18–32%). Она также диспергировала на 8–15% сформированные биопленки данных бацилл и *Y. pseudotuberculosis* (табл. 1).

Высокоактивная щелочная фосфатаза из этого же штамма морской бактерии *C. amphilecti* КММ 296 в концентрации 1–2 ед./мл ингибировала образование биопленок у исследуемых видов при инкубировании в течение трех суток при температуре 20–22°C на 20–50%. Разрушение зрелых биопленок составило 5–35% (табл. 1). Это согласуется с данными, полученными для штаммов условно-патогенных бактерий *P. aeruginosa*, *B. subtilis* и *Salmonella enteitidis*, выделенных из замороженных пищевых полуфабрикатов (Balabanova et al., 2017). Преимущество фермента из морского источника заключается в его способности с высокой эффективностью катализировать реакции при пониженных температурах. Это актуально для пищевой промышленности и медицины. Дозозависимый эффект ингибирования и разрушения биопленок щелочными фосфатазами морских бактерий может быть результатом их влияния на механизмы межклеточных коммуникаций бактерий.

Одним из важнейших компонентов матрикса является ДНК. Она играет важную роль в развитии биопленки, обеспечивая ее структурную стабильность и защиту от антимикробных агентов (Gilan, Sivan, 2013). Опубликованы сведения о влиянии нуклеаз на формирование и разрушение биопленок грамположительных и грамотрицательных бактерий (Nijland et al., 2010). Нами показано, что во внеклеточном матриксе биопленки *Y. pseudotuberculosis* присутствует ДНК и ее разру-

шение ДНКазой I приводит к уменьшению количества образующейся биопленки (Герентьева и др., 2015). Об этом же свидетельствуют результаты экспериментов по разрушению уже образовавшейся биопленки *Y. pseudotuberculosis* данным ферментом.

ДНКазы гепатопанкреаса краба оказывала аналогичное действие на биопленки *Y. pseudotuberculosis*. При концентрации ДНКазы 20 мкг/мл ингибирование составило 50%. Расщепление внеклеточной ДНК приводит к изменению структуры матрикса биопленки, что позволяет проникать антибиотикам. Таким образом, ДНКазы могут усиливать действие антибиотиков, что приводит к снижению биомассы биопленки и количества КОЕ (Nijland et al., 2010).

Современное представление о биопленках позволяет говорить об изменении подходов к диагностике и лечению инфекций в разных областях медицины и ветеринарии. К настоящему времени разработан ряд перспективных стратегий для борьбы с биопленками. Терапевтическое воздействие на биопленки может быть направлено на механизмы первоначальной адгезии бактерий к поверхности, на нарушение или усиление межклеточного обмена информацией, а также на блокирование синтеза или разрушение полимерного матрикса. Антибиопленочные агенты могут ингибировать формирование биопленок или разрушать зрелые биопленки, действовать отдельно или в сочетании с традиционными антибиотиками. Благодаря способности ферментов морских организмов функционировать с высокой скоростью при пониженных температурах, изученные гидролитические ферменты могут найти применение в борьбе с биопленками в том числе и в медицине. Подобное лечение, действующее на структуру или функции биопленок, может оказаться более эффективным, чем стандартная антибактериальная терапия.

## 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

- Голотин В.А., Балабанова Л.А., Буйновская Н.С. и др. Щелочная фосфатаза морской бактерии *Cobecia marina* как инструмент в исследовании свойств рекомбинантных белков // Вестн. ДВО РАН. 2015. № 6(184). С. 125–131.

- Кузнецов В.Г., Лаженцева Л.Ю., Елисейкина М.Г. и др. Распространение бактерий рода *Yersinia* в морской воде и гидробионтах // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. 2006. № 53. С. 117–120.
- Мензорова Н.И., Маркова А.В., Рассказов В.А. Высоко-стабильная Са, Mg-зависимая ДНКазы из гепатопанкреаса камчатского краба // Биохимия. 1994. Т. 59. С. 449–456.
- Патент РФ № 2012142209/10, 03.10.2012. Плазмида 40Gal, определяющая синтез  $\alpha$ -галактозидазы  $\alpha$ -PsGal, штамм *E. coli rosetta* (DE3)/40Gal – продуцент химерного белка, включающего аминокислотную последовательность  $\alpha$ -PsGal, и способ ее получения // Патент России № 2504583. 2014. Бюлл. № 2 / Балабанова Л.А., Голотин В.А., Бакунина И.Ю., Рассказов В.А.
- Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина // Журн. микробиол. 2011. № 33. С. 99–109.
- Слепченко Л.В., Балабанова Л.А., Бакунина И.Ю. и др. Свойства и возможная биологическая роль  $\alpha$ -галактозидазы морской бактерии *Pseudoalteromonas* spp. KMM 701 // Вестн. ДВО РАН. 2017. № 2. С. 51–58.
- Сомов Г.П. Современные представления о сапронозах и сапрозоонозах // Ветеринар. патология. 2004. № 3. С. 31–35.
- Терентьева Н.А., Тимченко Н.Ф., Балабанова Л.А. и др. Характеристика образования, ингибирования и разрушения биопленок *Yersinia pseudotuberculosis*, формирующихся на абиотических поверхностях // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. 2015. № 3. С. 72–78.
- Bakunina I., Slepchenko L., Anastuyk S. et al. Characterization of properties and transglycosylation abilities of recombinant  $\alpha$ -galactosidase from cold-adapted marine bacterium *Pseudoalteromonas* KMM 701 and its C494N and D451A mutants // Mar. Drugs. 2018. V. 16. № 10. P. 349.
- Balabanova L.A., Bakunina I.Yu., Nedashkovskaya O.I. et al. Molecular characterization and therapeutic potential of a marine bacterium *Pseudoalteromonas* spp. KMM 701  $\alpha$ -galactosidase // Mar. Biotechnol. 2010. V. 12. P. 111–120.
- Balabanova L., Podvolotskaya A., Slepchenko L. et al. Nucleolytic enzymes from the marine bacterium *Cobetia amphilecti* KMM 296 with antibiofilm activity and bio-preservative effect on meat products // Food Control. 2017. V. 78. P. 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.029>
- Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections // Science. 1999. V. 284. P. 1318–1322.
- Fleming D., Rumbaugh K.P. Approaches to dispersing medical biofilms // Microorganisms. 2017. V. 5. Art. ID 15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5020015>
- Flemming H.C., Wingender J. The biofilm matrix // Nat. Rev. Microbiol. 2010. V. 8. P. 623–633.
- Gilan I., Sivan A. Extracellular DNA plays an important structural role in the biofilm of the plastic degrading actinomycete *Rhodococcus ruber* // Adv. Microbiol. 2013. V. 3. P. 543–551.
- Lazar V. Quorum sensing in biofilms – How to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power? // Anaerobe. 2011. V. 17. № 6. P. 280–285.
- Nijland R., Hall M.J., Burgess J.G. Dispersal of biofilms by secreted, matrix degrading, bacterial DNase // PLoS One. 2010. V. 5. № 12; Art. ID e15668. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015668>
- Noskova Y.A., Balabanova L.A., Terentieva N.A. Alkaline phosphatase/phosphodiesterase from marine bacterium *Cobetia amphilecti* KMM 296 // Vestn. Dal'nevost. Otd. Ross. Akad. Nauk. 2018. № 6. Supplement. P. 94–95.
- O'Toole G.A. Microtiter dish biofilm formation assay // J. Visualized Exp. 2011. V. 47. Art. ID e2437. <https://doi.org/10.3791/2437>
- Römling U., Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies // J. Intern. Med. 2012. V. 272. P. 541–561.

## Hydrolytic Enzymes from Marine Organisms as Inhibitors of Biofilm Formation

N. A. Terenteva<sup>a</sup>, N. S. Buinovskaya<sup>a</sup>, Yu. A. Noskova<sup>a</sup>, L. V. Slepchenko<sup>a,b</sup>, O. I. Nedashkovskaya<sup>a</sup>, L. A. Tekuteva<sup>b</sup>, and L. A. Balabanova<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690022, Russia

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

Effects of some hydrolytic enzymes from marine organisms on the formation and destruction of bacterial biofilms have been studied. As the results show, the presence of  $\alpha$ -D-galactosidase from the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. KMM 701 stimulates the growth of biofilms formed by various species of marine bacteria, whereas the biofilm formation by *Bacillus subtilis* and *Yersinia pseudotuberculosis* is inhibited by this enzyme. Treatment with  $\alpha$ -galactosidase causes destruction of 5 to 35% of a mature biofilm of different bacterial species. Phosphodiesterase and alkaline phosphatase of the marine bacterium *Cobetia amphilecti* KMM 296 have an inhibitory effect on biofilm formation by marine strains of *B. licheniformis*, *B. aegricola*, and *B. berkelegi*, and also degrade already formed biofilms of these bacilli and *Yersinia*. The crab hepatopancreas DNase inhibits the biofilm formation by *Y. pseudotuberculosis* and *B. subtilis*, partially degrading a mature biofilm.

**Keywords:** biofilm, inhibitors, marine microorganisms, enzymes