

СОДЕРЖАНИЕ

Том 47, номер 3, 2021

Обзор

Являются ли фукоиданы бурых водорослей антиоксидантами?

Т. И. Имбс, С. П. Ермакова

147

Оригинальные статьи

Осмोटическая и ионная регуляция у дальневосточной крупночешуйной красноперки *Tribolodon hakonensis* (Günther, 1877) (Cypriniformes: Cyprinidae) в море и реках

В. И. Мартемьянов, Н. Е. Ламаш, А. М. Андреева

153

Состав липидов и окислительные процессы в крови и во внутренних органах антарктического клыкача *Dissostichus mawsoni* Norman, 1937 (Nototheniidae)

Д. В. Микряков, И. И. Гордеев, В. Р. Микряков

160

Сравнительный анализ формы отолитов у ставриды *Trachurus mediterraneus* (Steindachner, 1868) (Perciformes: Scaridae) из прибрежных вод Севастополя и Балаклавы (Чёрное море)

М. В. Чесалин

167

Интегрированный ответ биомаркеров при оценке качества морской среды на примере двустворчатого моллюска *Mytilus trossulus* (Gould, 1850)

А. А. Истомина, А. А. Мазур, В. П. Челомин, С. П. Кукла, В. В. Слободскова, А. Ю. Звягинцев, Ю. В. Федорец, О. А. Еловская, Л. Ф. Колосова

176

Генетический анализ морского блюдечка *Lottia cf. borealis* (Patellogastropoda: Lottiidae) из дальневосточных морей России

С. Н. Шарина, В. В. Маляр, А. В. Чернышев

184

Ультраструктура и автотрофная функция клеток рафидофитовой микроводоросли *Heterosigma akashiwo* (Y. Nada) Y. Nada ex Y. Nara and M. Chihara, 1987 в загрязненной медью среде

Ж. В. Маркина

196

Новые и малоизвестные виды макроводорослей дальневосточных морей России

О. С. Белоус, А. В. Скрипцова, Т. В. Титлянова

202

Таксономическое разнообразие культивируемых углеводородокисляющих бактерий в Японском море

Е. А. Богатыренко, А. В. Ким, Т. И. Дункай, А. Л. Пономарева, А. И. Еськова, М. Л. Сидоренко, А. К. Окулов

209

Contents

Volume 47, No 3, 2021

Review

- May Fucoidans of Brown Algae be Considered Antioxidants?
T. I. Imbs, S. P. Ermakova 147
-

Original papers

- Osmotic and Ionic Regulation in the Far Eastern Big-Scaled Redfin *Tribolodon hakonensis* (Günther, 1877) (Cypriniformes: Cyprinidae) in the Sea and in Rivers
V. I. Martemyanov, N. E. Lamash, A. M. Andreeva 153
- Lipid Composition and Oxidation Processes in the Blood and Internal Organs of the Antarctic Toothfish *Dissostichus mawsoni* Norman, 1937 (Nototheniidae)
D. V. Mikryakov, I. I. Gordeev, V. R. Mikryakov 160
- Otolith Shape Analysis of the Mediterranean Horse Mackerel, *Trachurus mediterraneus* (Steindachner, 1868) (Perciformes: Carangidae) from the Coastal Waters of Sevastopol and Balaklava (the Black Sea)
M. V. Chesalin 167
- Integrated Response of Biomarkers in the Assessment of the Quality of the Marine Environment on the Example of the Bivalve Mollusk *Mytilus trossulus* (Gould, 1850)
A. A. Istomina, A. A. Mazur, V. P. Chelomin, S. P. Kukla, V. V. Slobodskova, A. Yu. Zvyagintsev, Yu. V. Fedorets, O. A. Yelovskaya, L. F. Kolosova 176
- A Genetic Analysis of the Limpet *Lottia cf. borealis* (Patellogastropoda: Lottiidae) from the Far Eastern Seas of Russia
S. N. Sharina, V. V. Malyar, A. V. Chernyshev 184
- The Cell Ultrastructure and Autotrophic Function of the Raphidophyte Alga *Heterosigma akashiwo* (Y. Hada) Y. Hada ex Y. Hara and M. Chihara, 1987 Under Copper Exposure
Zh. V. Markina 196
- New and Little-Known Species of Macroalgae from the Far Eastern Seas of Russia
O. S. Belous, A. V. Skriptsova, T. V. Titlyanova 202
- Taxonomic Diversity of Culturable Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria in the Sea of Japan
E. A. Bogatyrenko, A. V. Kim, T. I. Dunkai, A. L. Ponomareva, A. I. Es'kova, M. L. Sidorenko, A. K. Okulov 209
-
-

ЯВЛЯЮТСЯ ЛИ ФУКОИДАНЫ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ АНТИОКСИДАНТАМИ?

© 2021 г. Т. И. Имбс¹, *, С. П. Ермакова¹

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

*e-mail: tatyanaimb@mail.ru

Поступила в редакцию 12.11.2020 г.

После доработки 17.12.2020 г.

Принята к публикации 23.12.2020 г.

Анализ результатов исследований антиоксидантной активности (АОА) фукоиданов показал, что в научной литературе способность фукоиданов поглощать активные формы кислорода все еще является предметом дискуссии. С одной стороны, эксперименты *in vitro* и *in vivo* свидетельствуют о том, что фукоиданы бурых водорослей, регулируя системы антиоксидантной защиты и сигнальных путей, способны модулировать заболевания, обусловленные окислительным стрессом. С другой стороны, бесклеточные тест-системы демонстрируют связь приписываемой фукоиданам антиоксидантной активности с полифенольными соединениями, которые экстрагируются вместе с фукоиданами. Полифенольные соединения бурых водорослей – флоротаннины, известны как сильные антиоксиданты. В подавляющем большинстве исследований используются коммерческие препараты или экстракты, содержащие фукоидан и полифенольные соединения, однако содержание полифенольных соединений в образцах полисахаридов не определяется. В связи с этим до сих пор отсутствует четкое понимание, кому принадлежит приоритет в АОА – фукоиданам или экстрагирующимся с ними полифенольным соединениям.

Ключевые слова: бурые водоросли, фукоиданы, полифенолы, антиоксидантная активность, окислительный стресс

DOI: 10.31857/S0134347521030050

Известно, что аэробные организмы не способны жить и развиваться в отсутствие кислорода (Li et al., 2017). В живой клетке постоянно образуются активные формы кислорода (АФК) как продукты его нормального метаболизма. Наибольшее значение в биологических системах имеют такие АФК, как синглетный кислород, супероксид анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$), пероксид водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал (OH^{\cdot}), пероксильный радикал (ROO^{\cdot}), оксид азота (NO^{\cdot}) и пероксинитрит ($ONOO^-$) (Lim et al., 2014; Schieber, Chandel, 2014). В клетках живых организмов АФК индуцируют разнообразные свободнорадикальные окислительные реакции. Развитие свободнорадикального окисления может быть прекращено ингибиторами, восстанавливающими свободные радикалы в стабильную молекулярную форму. Вещества, способные переводить свободные радикалы в неактивные формы, называются антиоксидантами. При нормальном развитии организма свободнорадикальное окисление контролируется активностью собственных антиоксидантных систем, представленных ферментами супероксиддисмутазой

(SOD), каталазой (CAT), пероксидазой и глутатионредуктазой, а также низкомолекулярными липофильными и водорастворимыми соединениями (витаминами E, A и C, глутатионом, убихиноном, таурином и др.) (Cuzzocrea et al., 2001; Pisoschi, Pop, 2015). Однако несбалансированность между прооксидантными и антиоксидантными системами, обусловленная факторами окружающей среды и патологическими процессами, вызывает окислительный стресс, который приводит к развитию сахарного диабета, а также является причиной и важной составляющей онкологических, сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний, в том числе болезни Альцгеймера (Rahal et al., 2014; Li et al., 2017). Большое значение имеет фармакологическая поддержка собственных антиоксидантных систем организма. В этом направлении перспективными оказываются препараты на основе бурых водорослей, которые содержат комплекс веществ, обладающих антиоксидантным действием. Среди них каротиноид фукоксантин (D’Orazio et al., 2012), полифенольные соединения флоротаннины (Имбс, Звягинцева, 2018) и сульфатированные

полисахариды фукоиданы, антиоксидантные свойства которых подтверждены в экспериментах *in vitro* и *in vivo* (Balboa et al., 2019; Wang et al., 2019; Zhong et al., 2019).

Универсальный метод оценки антиоксидантной активности (АОА) биологически активных веществ отсутствует. Свободнорадикальное окисление представляет собой цепь разветвленных реакций, инициированных разными видами АФК. Продукты деградации молекул, образовавшиеся в ходе этих реакций, обладают собственной активностью. Результаты, полученные с помощью лишь одного теста, по отношению к биологическим объектам можно интерпретировать с большой осторожностью. Поэтому в настоящее время АОА *in vitro* оценивают с использованием нескольких тест-систем, которые классифицируют по способности антиоксидантов ингибировать окислительное действие активных радикалов и реакционно-способных веществ. Первичными антиоксидантами называются вещества, которые действуют как акцепторы/поглотители свободных радикалов и ингибируют стадию инициации или прерывают стадию распространения автоокисления. Вторичные антиоксиданты — это “профилактические” антиоксиданты. С помощью различных механизмов они замедляют скорость реакций окисления: выступают в роли хелаторов для прооксидантов (ионов металлов), поставляют H^+ первичным антиоксидантам, деактивируют синглетный кислород, поглощают ультрафиолетовое излучение или действуют как поглотители кислорода. Основное различие между первичными и вторичными антиоксидантами состоит в том, что вторичные антиоксиданты не превращают свободные радикалы в стабильные молекулы (Lim et al., 2014).

Для измерения антиоксидантной способности веществ наиболее часто используют следующие методы: ингибирование радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (DPPH) (Shimada et al., 1992) или катион-радикала 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоната) (ABTS) (Re et al., 1999); определение общей антиоксидантной активности (ТАС) (Prieto et al., 1999); определение способности поглощать радикалы кислорода (ORAC) (Cao et al., 1993); метод, основанный на восстановлении ионов трехвалентного железа (FRAP) (de Avellar et al., 2004); тесты по улавливанию супероксид-анионов и гидроксильных радикалов (Lim et al., 2014) и др. В настоящее время в качестве стандартов для количественной оценки АОА приняты водорастворимый аналог токоферола (витамина Е) тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота), а также аскорбиновая (AAEq) и галловая (GAEq) кислоты. Их активность условно принимают за единицу, а антиоксидантную активность исследуемого вещества выражают в эквивалентных единицах тро-

локса (ЕТ) (Böhm et al., 2002), аскорбиновой или галловой кислот (Kim et al., 2002) на массу образца.

Антиоксидантная активность фукоидана в экспериментах in vitro

Способность фукоиданов поглощать АФК описана в ряде публикаций. Так, показано, что низкомолекулярный (27 кДа) сульфатированный (25.19%) фукоидан F3 из *Undaria pinnatifida* умеренно ингибировал радикал DPPH (68.65% при концентрации образца 1 мг/мл) (Mak et al., 2013). В другом исследовании разные фракции сульфатированного фукоидана из *U. pinnatifida* в концентрации 1 мг/мл ингибировали радикал DPPH на 18–55% (Hu et al., 2010). Низкосульфатированный (15.2%) полисахарид STP-1 (молекулярная масса 190.4 кДа) из *Sargassum thunbergii* в концентрации 0.4 мг/мл ингибировал радикал DPPH на 95.23% (Ren et al., 2017). Отмечено, что полисахариды из *Sargassum* sp. обычно проявляли высокую способность к захвату свободного радикала DPPH. Неочищенные фракции фукоиданов FCSP-1 и FCSP-2 (в концентрации 1 мг/л), выделенные разными способами экстракции из *Fucus evanescens*, ингибировали радикал DPPH на 57.6 и 19.4% соответственно (Imbs et al., 2015). Фракции различались по содержанию полифенольных соединений, урсоловых кислот и сульфатных групп. Дальнейшая очистка фукоиданов FCSP-1 и FCSP-2 методом хроматографии на ионообменном носителе позволила получить высокосульфатированные фракции 1F4 и 2F3, которые значительно различались по способности ингибировать радикалы DPPH (39.1 и 3.8% соответственно) и ABTS (10.1 и 1.3% соответственно). Во фракции 1F4 содержание полифенолов было почти в 20 раз больше, чем во фракции 2F3. Значения ТАС у этих фукоиданов варьировали от 1.3 до 52.0 мг ААEq/г и были выше во фракциях, обогащенных полифенолами (Imbs et al., 2015). Значения ТАС сульфатированных полисахаридов, полученных из *Canistrocarpus cervicorvis*, изменялись от 20.9 до 39.4 мг ААEq/г (Camara et al., 2011). Среди фракций фукоидана из *Sargassum tenerimum* с ТАС от 6.13 до 41.6 мг ААEq/г наибольшее значение определено для фракций неочищенного фукоидана (Marudhupandi et al., 2014). Следует отметить, что значение ТАС более 9 мг ААEq/г рассматривается как повышенная антиоксидантная активность (Chandini et al., 2008). Перечисленные выше фукоиданы из разных видов бурых водорослей в той или иной степени проявляли АОА, однако связь между структурой фукоидана и механизмом его антиоксидантного действия до сих пор не выяснена. Предполагается, что антиоксидантные свойства фукоидана определяются его молекулярной массой (Hou et al., 2012; Álvarez-Viñas et al., 2019), структурными особенностями, в частности, сте-

пенью сульфатирования и положением сульфатных групп (Wang et al., 2009; Marudhupandi et al., 2014), или содержанием глюкуроновой кислоты и фукозы в молекуле полисахарида (Zhao et al., 2008). Однако в ряде исследований отмечено отсутствие положительной корреляции между АОА фукоиданов и содержанием перечисленных групп (Samara et al., 2011; Imbs et al., 2015).

В последние годы появились исследования, доказывающие, что на способность фукоиданов поглощать АФК влияют не их структурные особенности, а примесные полифенольные соединения. Установлено, что в 100 г коммерческого фукоидана из *Fucus vesiculosus* (Sigma-Aldrich, Испания) содержание полифенолов варьирует от 260 до 960 мг эквивалента флороглюцина (Diaz-Rubio et al., 2009). Известно, что взаимодействие потенциального антиоксиданта с радикалом DPPH зависит от его структурной характеристики: число восстановленных молекул DPPH должно коррелировать с количеством электронодонорных гидроксильных групп в молекуле антиоксиданта (Mensor et al., 2001). Этому требованию соответствуют флоротаннины – полифенольные соединения, которые, как правило, экстрагируются вместе с полисахаридами в процессе их выделения (Balboa et al., 2019; Pozharitskaya et al., 2020). Флоротаннины содержат большое количество гидроксильных групп, хорошо растворяются в воде, прочно связываются с полисахаридами и другими биополимерами и имеют полимерную структуру. В результате исследования АОА фукоиданов из *F. evanescens* показано (Imbs et al., 2015), что она положительно коррелировала с содержанием в фукоиданах примесных полифенолов и не зависела от степени сульфатирования или содержания уроновой кислоты и фукозы в полисахариде. Авторы предположили, что полифенолы определяют АОА полисахарида. В другом исследовании (Lahrsen et al., 2018) при деполимеризации коммерческого фукоидана из *F. vesiculosus* перекисью водорода был получен образец фукоидана, который не содержал полифенольные примеси и не проявлял АОА, обнаруженную в исходном образце. Это подтвердило высказанное ранее предположение о том, что антиоксидантную активность проявляют экстрагирующиеся вместе с фукоиданом полифенольные соединения (Schneider et al., 2015), а не фукоидан. Известно, что полифенолы – это сильные антиоксиданты, которые проявляют активность в малых концентрациях (Audibert et al., 2010; Имбс, Звягинцева, 2018). Флоротаннины способны восстанавливать радикал DPPH примерно в 2–10 раз эффективнее, чем коммерческие антиоксиданты катехин, α -токоферол и аскорбиновая кислота (Wang et al., 2012). Из сказанного следует, что для использования фукоиданов в тестах по определению АОА необходимо предварительно анализировать образец на содер-

жание примесных полифенольных соединений и при необходимости проводить дополнительную очистку. Для определения содержания полифенолов используются химические методы (например, с использованием реактива Фолине–Чеколтэу) (см.: Kuda, Ikemori, 2009), методы УФ-спектроскопии (Imbs et al., 2015) или флуоресценции (Урванцева и др., 2004).

Существует мнение, что активность фукоидана по поглощению АФК в эксперименте *in vitro* в бесклеточных тест-системах может быть неактуальной в эксперименте на клеточных культурах. Фукоиданы из водорослей *Fucus vesiculosus*, *F. distichus*, *F. serratus*, *Laminaria digitata* и *Saccharina latissima* в предварительных бесклеточных тестах эффективно поглощали АФК. Исследование способности этих соединений предотвращать возрастную деграцию макулы (как защита от окислительного стресса) *in vitro* на клетках пигментного эпителия сетчатки глаза ARPE-19 и на клетках увеальной меланомы OMM-1 показало, что данные фукоиданы защищали клетки OMM-1 от окислительного стресса, увеличивая экспрессию SOD (см.: Dörschmann et al., 2019). Клетки ARPE-19 в отличие от клеток OMM-1 по своей природе очень устойчивы к окислительному стрессу (Klettner, 2012), и в условиях эксперимента их жизнеспособность защищал лишь фукоидан из *S. latissima*, а фукоиданы из *F. serratus* и *F. distichus* даже усугубляли действие стресса. Высказано предположение, что фукоиданы проявляют антиоксидантную активность, запуская “клеточные эффекты”, например, активируя антиоксидантные ферменты или действуя на разные клеточные сигнальные пути, причем их действие может различаться в зависимости от использованных в эксперименте типов клеток (Dörschmann et al., 2019). На нескольких экспериментальных моделях *in vitro* показано, что фукоиданы из разных источников ослабляли окислительный стресс, при этом были отмечены усиление экспрессии SOD и активация фактора транскрипции Nrf2 – “главного регулятора” реакции антиоксидантного стресса (Foresti et al., 2015; Ryu, Chung, 2016; Pittalà et al., 2017; Vomund et al., 2017; Wang et al., 2018; Kim et al., 2019).

Антиоксидантная активность фукоиданов в экспериментах in vivo

В экспериментах *in vivo* при повреждении организма животных, вызванном окислительным стрессом, фукоиданы оказывали терапевтическое действие, регулируя систему антиоксидантной защиты организма. Образцы фукоиданов из *Costaria costata* ингибировали окислительный стресс, индуцированный четыреххлористым углеродом: в печени животных снижался уровень малонового диальдегида (MDA) и повышалось содержание

SOD (см.: Wang et al., 2014). При использовании фукоидана из *Turbinaria decurrens* в концентрации 75 мг/кг уменьшалось вызванное алкоголем окислительное повреждение печени (Meenakshi et al., 2014). После кормления крыс-алкоголиков фукоиданом в печени животных снижался уровень маркеров перекисного окисления липидов MDA и тиобарбитуровой кислоты, повышалось содержание глутатиона (GSH) и антиоксидантных ферментов SOD, CAT и глутатионпероксидазы. При оральном введении коммерческого фукоидана из *F. vesiculosus* (Sigma) в концентрации 100 мг/кг отмечены облегчение течения неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) и ингибирование инсулинрезистентности, вызванные диетой с высоким содержанием жиров. При использовании фукоидана снижалась концентрация MDA и NO в печени и повышался уровень GSH, а также снижалась экспрессия факторов иммунной системы TNF- α , IL-1 β и мРНК, что уменьшало выработку АФК в печени (Heeba, Morsy, 2015). Коммерческий фукоидан фирмы Dalian Aquaculture Group Co., Ltd. (Dalian, China) активировал SOD и повышал уровень GSH, ингибировал апоптоз клеток PC12 и положительно влиял на когнитивную способность мышей в модели болезни Альцгеймера (Wei et al., 2017). Фукоидан из *Cladosiphon okamuranus* значительно ингибировал окисление липопротеинов низкой плотности и стеатоз печени у мышей с дефицитом аполипопротеина E, активируя липопротеинлипазу в плазме, а также благотворно влиял на состояние мышей с дислипидемией и атеросклерозом (Yokota et al., 2016). В другом исследовании способность фукоидана из *Laminaria japonica* предотвращать атеросклероз сосудов *in vivo* связывали с антиоксидантным (подавление путей сигнальной трансдукции АФК) и противовоспалительным действием полисахарида (Wang et al., 2016). При лечении НАЖБП у мышей с диабетом под действием низкомолекулярного фукоидана из *L. japonica* происходила активация сигнального пути SIRT1/AMPK/PGC1 α . Полисахарид, усиливая активность ферментов антиоксидантной защиты SOD и CAT, ингибировал продукцию супероксида, снижал активность фактора некроза опухоли TNF- α и экспрессию фактора транскрипции NF- κ B (Zheng et al., 2018). Эти исследования показали, что фукоиданы снижают выработку активных форм кислорода *in vivo*, а затем снимают окислительное повреждение опосредованно через различные сигнальные пути, связанные с окислительным стрессом.

Таким образом, фукоиданы демонстрировали способность *in vitro* и *in vivo* модулировать заболевания, связанные с окислительным стрессом, регулируя системы антиоксидантной защиты и сигнальные пути. Однако четкое понимание того, принадлежит эта способность фукоиданам или со-экстрагирующимся с ними полифенольным

соединениям, отсутствует, поскольку в большинстве исследований были использованы коммерческие препараты или экстракты, содержавшие одновременно фукоидан и полифенольные соединения, а содержание последних в исследованных образцах полисахаридов не было определено.

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 при поддержке гранта РФФИ № 21-53-54003.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Имбс Т.И., Звягинцева Т.Н. Флоротаннины – полифенольные метаболиты бурых водорослей // Биол. моря. 2018. Т. 44. № 4. С. 217–227.
- Урванцева А.М., Бакунина И.Ю., Ким Н.Ю. и др. Выделение очищенного фукоидана из природного комплекса с полифенолами и его характеристика // Химия растит. сырья. 2004. № 3. С. 15–24.
- Álvarez-Viñas M., Flórez-Fernández N., González-Muñoz M.J., Domínguez H. Influence of molecular weight on the properties of *Sargassum muticum* fucoidan // Algal Res. 2019. V. 38. Art. ID 101393. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.101393>
- Audibert L., Fauchon M., Blanc N. et al. Phenolic compounds in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*: distribution and radical-scavenging activities // Phytochem. Anal. 2010. V. 21. № 5. P. 399–405.
- Balboa E.M., Millán R., Demínguez H., Taboada C. *Sargassum muticum* hydrothermal extract: effects on serum parameters and antioxidant activity in rats // Appl. Sci. 2019. V. 9. Art. ID 2570. <https://doi.org/10.3390/app9122570>
- Böhm V., Puspitasari-Nienaber N.L., Ferruzzi M.G., Schwartz S.J. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of α -carotene, β -carotene, lycopene, and zeaxanthin // J. Agric. Food Chem. 2002. V. 50. № 1. P. 221–226.
- Camara R.B.G., Costa L.S., Fidelis G.P. et al. Heterofucans from the brown seaweed *Canistrocarpus cervicornis* with anticoagulant and antioxidant activities // Mar. Drugs. 2011. V. 9. P. 124–138.
- Cao G., Alessio H.M., Cutler R.G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants // Free Radical Biol. Med. 1993. V. 14. № 3. P. 303–311.
- Chandini S.K., Ganesan P., Bhaskar N. *In vitro* antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India // Food Chem. 2008. V. 107. P. 707–713.

- Cuzzocrea S., Riley D.P., Caputi A.P., Salvemini D.* Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury // *Pharmacol. Rev.* 2001. V. 53. P. 135–159.
- D'Orazio N., Gemello E., Gammone M.A. et al.* Fucoxanthin: a treasure from the sea // *Mar. Drugs.* 2012. V. 10. № 3. P. 604–616.
- de Avellar I.G.J., Magalhães M.M., Silva A.B. et al.* Reevaluating the role of 1,10-phenanthroline in oxidative reactions involving ferrous ions and DNA damage // *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* 2004. V. 1675. № 1–3. P. 46–53.
- Diaz-Rubio M.E., Pérez-Jimenez J., Saura-Calixto F.* Dietary fiber and antioxidant capacity in *Fucus vesiculosus* products // *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2009. V. 60. Suppl. 2. P. 23–34.
- Dörschmann P., Bittkau K.S., Neupane S. et al.* Effects of fucoidans from five different brown algae on oxidative stress and VEGF interference in ocular cells // *Mar. Drugs.* 2019. V. 17. Art. ID 258. <https://doi.org/10.3390/md17050258>
- Foresti R., Bucolo C., Platania C.M.B. et al.* Nrf2 activators modulate oxidative stress responses and bioenergetic profiles of human retinal epithelial cells cultured in normal or high glucose conditions // *Pharmacol. Res.* 2015. V. 99. P. 296–307.
- Heeba G.H., Morsy M.A.* Fucoidan ameliorates steatohepatitis and insulin resistance by suppressing oxidative stress and inflammatory cytokines in experimental non-alcoholic fatty liver disease // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2015. V. 40. № 3. P. 907–914.
- Hou Y., Wang J., Jin W. et al.* Degradation of *Laminaria japonica* fucoidan by hydrogen peroxide and antioxidant activities of the degradation products of different molecular weights // *Carbohydr. Polym.* 2012. V. 87. P. 153–159.
- Hu T., Liu D., Chen Y. et al.* Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Undaria pinnatifida* in vitro // *Int. J. Biol. Macromol.* 2010. V. 46. № 2. P. 193–198.
- Imbs T.I., Skriptsova A.V., Zvyagintseva T.N.* Antioxidant activity of fucose-containing sulfated polysaccharides obtained from *Fucus evanescens* by different extraction methods // *J. Appl. Phycol.* 2015. V. 27. P. 545–553.
- Klettner A.* Oxidative stress induced cellular signaling in RPE cells // *Front. Biosci., Scholar Ed.* 2012. V. 4. P. 392–411.
- Kim D.-O., Lee K.W., Lee H.J., Lee C.Y.* Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals // *J. Agric. Food Chem.* 2002. V. 50. № 13. P. 3713–3717.
- Kim H., Ahn J.H., Song M. et al.* Pretreated fucoidan confers neuroprotection against transient global cerebral ischemic injury in the gerbil hippocampal CA1 area via reducing of glial cell activation and oxidative stress // *Biomed. Pharmacother.* 2019. V. 109. P. 1718–1727.
- Kuda T., Ikemori T.* Minerals, polysaccharides and antioxidant properties of aqueous solutions obtained from macroalgal beach-casts in the Noto Peninsula, Ishikawa, Japan // *Food Chem.* 2009. V. 112. № 3. P. 575–581.
- Lahrsen E., Liewert I., Alban S.* Gradual degradation of fucoidan from *Fucus vesiculosus* and its effect on structure, antioxidant and antiproliferative activities // *Carbohydr. Polym.* 2018. V. 192. P. 208–216.
- Li H., Ding F., Xiao L. et al.* Food-derived antioxidant polysaccharides and their pharmacological potential in neurodegenerative diseases // *Nutrients.* 2017. V. 9. Art. ID 778. <https://doi.org/10.3390/nu9070778>
- Lim S.J., Aida W.M.W., Maskat M.Y. et al.* Isolation and antioxidant capacity of fucoidan from selected Malaysian seaweeds // *Food Hydrocolloids.* 2014. V. 42. P. 280–288.
- Mak W., Hamid N., Liu T. et al.* Fucoidan from New Zealand *Undaria pinnatifida*: Monthly variations and determination of antioxidant activities // *Carbohydr. Polym.* 2013. V. 95. № 1. P. 606–614.
- Marudhupandi T., Kumar T.T.A., Senthil S.L., Devi K.N.* In vitro antioxidant properties of fucoidan fractions from *Sargassum tenerimum* // *Pak. J. Biol. Sci.* 2014. V. 17. P. 402–407.
- Meenakshi S., Umayaparvathi S., Saravanan R. et al.* Hepatoprotective effect of fucoidan isolated from the seaweed *Turbinaria decurrens* in ethanol intoxicated rats // *Int. J. Biol. Macromol.* 2014. V. 67. P. 367–372.
- Mensor L.L., Menezes F.S., Leitão G.G. et al.* Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method // *Phyther. Res.* 2001. V. 15. № 2. P. 127–130.
- Pisoschi A.M., Pop A.* The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review // *Eur. J. Med. Chem.* 2015. V. 97. P. 55–74.
- Pittalà V., Fidilio A., Lazzara F. et al.* Effects of novel nitric oxide-releasing molecules against oxidative stress on retinal pigmented epithelial cells // *Oxid. Med. Cell. Longevity.* 2017. V. 2017. Art. ID 1420892. <https://doi.org/10.1155/2017/1420892>
- Pozharitskaya O.N., Obluchinskaya E.D., Shikov A.N.* Mechanisms of bioactivities of fucoidan from the brown seaweed *Fucus vesiculosus* L. of the Barents Sea // *Mar. Drugs.* 2020. V. 18. Art. ID 275. <https://doi.org/10.3390/md18050275>
- Prieto P., Pineda M., Aguilar M.* Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E // *Anal. Biochem.* 1999. V. 269. № 2. P. 337–341.
- Rahal A., Kumar A., Singh V. et al.* Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay // *BioMed Res. Int.* 2014. V. 2014. Art. ID 761264.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A. et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay // *Free Radical Biol. Med.* 1999. V. 26. № 9–10. P. 1231–1237.
- Ren B., Chen C., Li C. et al.* Optimization of microwave-assisted extraction of *Sargassum thunbergii* polysaccharides and its antioxidant and hypoglycemic activities // *Carbohydr. Polym.* 2017. V. 173. P. 192–201.
- Ryu M.J., Chung H.S.* Fucoidan reduces oxidative stress by regulating the gene expression of HO-1 and SOD-1 through the Nrf2/ERK signaling pathway in HaCaT cells // *Mol. Med. Rep.* 2016. V. 14. P. 3255–3260.

- Schieber M., Chandel N.S.* ROS function in redox signaling and oxidative stress // *Curr. Biol.* 2014. V. 24. № 10. P. 453–462.
- Schneider T., Ehrig K., Liewert I., Alban S.* Interference with the CXCL12/CXCR4 axis as potential antitumor strategy: superiority of a sulfated galactofucan from the brown alga *Saccharina latissima* and Fucoïdan over heparins // *Glycobiology.* 2015. V. 25. P. 812–824.
- Shimada K., Fujikawa K., Yahara K., Nakamura T.* Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion // *J. Agric. Food Chem.* 1992. V. 40. P. 945–948.
- Vomund S., Schäfer A., Parnham M.J. et al.* Nrf2, the master regulator of anti-oxidative responses // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. Art. ID 2772. <https://doi.org/10.3390/ijms18122772>
- Wang T., Jónsdóttir R., Liu H. et al.* Antioxidant capacities of phlorotannins extracted from the brown algae *Fucus vesiculosus* // *J. Agric. Food Chem.* 2012. V. 60. № 23. P. 5874–5883.
- Wang J., Liu L., Zhang Q. et al.* Synthesized oversulphated, acetylated and benzoylated derivatives of fucoïdan extracted from *Laminaria japonica* and their potential antioxidant activity in vitro // *Food Chem.* 2009. V. 114. P. 1285–1290.
- Wang X., Pei L., Liu H. et al.* Fucoïdan attenuates atherosclerosis in LDLR^{-/-} mice through inhibition of inflammation and oxidative stress // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2016. V. 9. P. 6896–6904.
- Wang Q., Song Y., He Y. et al.* Structural characterisation of algae *Costaria costata* fucoïdan and its effects on CCl₄-induced liver injury // *Carbohydr. Polym.* 2014. V. 107. P. 247–254.
- Wang Y., Xing M., Cao Q. et al.* Biological activities of fucoïdan and the factors mediating its therapeutic effects: a review of recent studies // *Mar. Drugs.* 2019. V. 17. Art. ID 183. <https://doi.org/10.3390/md17030183>
- Wang Y.-Q., Wei J.-G., Tu M.-J. et al.* Fucoïdan alleviates acetaminophen-induced hepatotoxicity via oxidative stress inhibition and Nrf2 translocation // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. Art. ID 4050. <https://doi.org/10.3390/ijms19124050>
- Wei H.Y., Gao Z.X., Zheng L.P. et al.* Protective effects of fucoïdan on A β 25-35 and D-Gal-induced neurotoxicity in PC12 cells and D-Gal-induced cognitive dysfunction in mice // *Mar. Drugs.* 2017. V. 15. Art. ID 77. <https://doi.org/10.3390/md15030077>
- Yokota T., Nomura K., Nagashima M., Kamimura N.* Fucoïdan alleviates high-fat diet-induced dyslipidemia and atherosclerosis in ApoE^{shl} mice deficient in apolipoprotein E expression // *J. Nutr. Biochem.* 2016. V. 32. P. 46–54.
- Zhao X., Xue C.-H., Li B.-F.* Study of antioxidant activities of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica* // *J. Appl. Phycol.* 2008. V. 20. P. 431–436.
- Zheng Y., Liu T., Wang Z. et al.* Low molecular weight fucoïdan attenuates liver injury via SIRT1/AMPK/PGC1 α axis in db/db mice // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. V. 112. P. 929–936.
- Zhong Q., Wei B., Wang S. et al.* The antioxidant activity of polysaccharides derived from marine organisms: an overview // *Mar. Drugs.* 2019. V. 17. Art. ID 674. <https://doi.org/10.3390/md17120674>

May Fucoïdians of Brown Algae be Considered Antioxidants?

T. I. Imbs^a and S. P. Ermakova^a

^aG.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690022, Russia

The ability of fucoïdians to scavenge reactive oxygen species still remains a subject of debate in scientific literature, as shown by an analysis of results of recent studies on fucoïdians' antioxidant activity (AOA). On the one hand, in vitro and in vivo experiments provide evidence that fucoïdians of brown algae can modulate diseases associated with oxidative stress by regulating the antioxidant defense systems and signaling pathways. On the other hand, the use of "cell-free" test systems has revealed a relationship between the antioxidant activity attributed to fucoïdians and the polyphenolic compounds extracted along with them. The polyphenolic compounds of brown algae referred to as phlorotannins are also known as potent antioxidants. Since the vast majority of studies use various commercial preparations or extracts containing fucoïdan and polyphenolic compounds without measuring the level of the latter in polysaccharide samples, there is still no clear understanding of whether fucoïdians or polyphenolic compounds, extracted along with them, are a priority component providing AOA.

Keywords: brown algae, fucoïdians, polyphenols, antioxidant activity, oxidative stress

ОСМОТИЧЕСКАЯ И ИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ У ДАЛЬНЕВОСТОЧНОЙ КРУПНОЧЕШУЙНОЙ КРАСНОПЕРКИ *TRIBOLODON HAKONENSIS* (GÜNTHER, 1877) (CYPRINIFORMES: CYPRINIDAE) В МОРЕ И РЕКАХ

© 2021 г. В. И. Мартемьянов^{1, *}, Н. Е. Ламаш^{1, 2}, А. М. Андреева¹

¹Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, пос. Борок 152742, Россия

²Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (ННЦМБ ДВО РАН), Владивосток 690041, Россия

*e-mail: martem@ibiw.yaroslavl.ru

Поступила в редакцию 12.02.2020 г.

После доработки 30.07.2020 г.

Принята к публикации 29.09.2020 г.

У дальневосточной крупночешуйной красноперки *Tribolodon hakonensis* (Günther, 1877) определены характерные для рыб, отловленных в море и реках, значения осмоляльности, а также содержание натрия и калия, общей, свободной и связанной фракций воды в сыворотке крови, мышцах, печени и мозге. Осмоляльность, обусловленная неорганическими ионами (Osm_{inorg}), не различалась во внутренней среде (сыворотка крови), в мышцах, печени и мозге отловленной в море красноперки на IV стадии зрелости гонад. У рыб, отловленных в море перед заходом в реку на нерест (V стадия зрелости гонад), в реках после нереста (VI–II стадия зрелости гонад) и в период зимовки (IV стадия зрелости гонад), Osm_{inorg} в мышцах, печени и мозге была достоверно ниже, чем в сыворотке крови. Для поддержания осмотического равновесия с внутренней средой недостаток электролитов в тканях организма компенсировался за счет накопления органических осмолитов. Переход красноперки из рек в море сопровождался достоверным повышением Osm_{inorg} в сыворотке крови в среднем на 9.4–18.7%. В ответ на это как приспособление в клетках мышечной ткани увеличивалась концентрация натрия и калия, а в клетках печени и мозга накапливался калий.

Ключевые слова: сыворотка, мышцы, печень, мозг, осмотическая концентрация, натрий, калий, общая, свободная, связанная фракция воды

DOI: 10.31857/S0134347521030086

Дальневосточные красноперки рода *Tribolodon* – единственные представители рыб семейства Cyprinidae, осуществляющие миграции между морем и реками. В ходе годового цикла красноперки этого рода совершают по две миграции в реки и море. В период с апреля по июнь производители мигрируют из моря на нерестилища в бассейны рек Приморья, Сахалина, Кореи и Японии. После нереста они возвращаются в море. Вышедшие из грунта личинки сразу скатываются в море. Летом и осенью рыбы нагуливаются в море, с ноября по февраль–март зимуют в реках, затем мигрируют для кратковременного (март–апрель) нагула в море и вновь идут в реки на нерест (Гавренков, 1998; Гавренков, Свиридов, 2001; Свиридов, 2002).

Основой для выживания рыб в условиях разной солёности среды является способность поддерживать осмотическое равновесие между внутренней средой и внутриклеточной жидкостью органов и тканей организма для обеспечения поддержания объема клеток на стабильном уровне. Осмотиче-

ской активностью обладают неорганические ионы и многие органические вещества. Поэтому общая осмоляльность (Osm_{total}) разных жидкостей организма включает два компонента, один из которых представляет неорганические электролиты (Osm_{inorg}), другой – органические осмолиты (Osm_{org}). В норме при стабильных условиях осмоляльность сыворотки крови ($Osm_{total\ serum}$), межклеточной ($Osm_{total\ extra}$) и внутриклеточной ($Osm_{total\ intra}$) жидкостей уравновешены между собой ($Osm_{total\ serum} = Osm_{total\ extra} = Osm_{total\ intra}$). Поскольку $Osm_{total} = Osm_{inorg} + Osm_{org}$, то из этого равенства следует: $Osm_{inorg\ serum} + Osm_{org\ serum} = Osm_{inorg\ extra} + Osm_{org\ extra} = Osm_{inorg\ intra} + Osm_{org\ intra}$.

Osm_{total} внутренней среды организма и физиологических растворов определяется, как правило, методом криоскопии, который позволяет оценить общий вклад неорганических электролитов и органических осмолитов. Однако этот метод не удается применить для измерения Osm_{total} в раз-

ных органах и тканях, поэтому данные по Osm_{total} в тканевых жидкостях организма отсутствуют. Предлагается использовать метод кондуктометрии, который позволяет оценить вклад Osm_{inorg} во внутренней среде, в эритроцитах, разных тканях и органах рыб (Мартемьянов, 2014, 2020; Мартемьянов, Васильев, 2018).

У красноперок рода *Tribolodon* исследованы генетические показатели (Врукон et al., 2011, 2013), сезонная динамика состава и содержания белков в жидкостях организма (Андреева и др., 2015а, 2015б), но не изучены показатели осмотического и ионного гомеостаза красноперок, мигрирующих в ходе годового цикла из моря в реки и обратно.

Цель настоящей работы – определить Osm_{inorg} , содержание натрия, калия и воды (общей, свободной и связанной фракций) в сыворотке крови, мышцах, печени и мозге дальневосточной крупночешуйной красноперки *Tribolodon hakonensis*, отловленной в море и реках.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа выполнена на дальневосточной крупночешуйной красноперке *Tribolodon hakonensis* (Günther, 1877) (Cypriniformes: Cyprinidae), отловленной в зал. Восток Японского моря и в реках Раздольная и Волчанка. Даты взятия проб, координаты мест отлова и стадии зрелости гонад исследованных рыб приведены в табл. 1. Стадию зрелости гонад определяли по шкале, применяемой в ихтиологической и рыбоводной практике (Сакун, Буцкая, 1968).

Кровь отбирали сразу после отлова рыб из хвостовых кровеносных сосудов. Сыворотку получали, отстаивая кровь при температуре 4°C в холодильнике. Сыворотку отделяли от эритроцитов и хранили в пластиковых пробирках. Пробы мышечной ткани (150–200 мг), печени (150–200 мг) и центральной части мозга (100–150 мг) помещали на плотную обеззоленную бумагу и взвешивали, а затем высушивали при комнатной температуре.

В пластиковых контейнерах пробы были доставлены в Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН. В лаборатории для анализа проб сыворотки использовали полоски обеззоленной фильтровальной бумаги размером 5 × 10 мм. При насыщении такой полоски жидкостью после взвешивания пробы значительная часть жидкости остается на столике весов, искажая результат при расчетах. Чтобы исключить потерю жидкости, использовали отрезки тонкой медной проволоки длиной 2–3 см, загнутые с двух сторон в виде крючков. Полоску бумаги, подвешенную на крючке, окунали в пробирку с сывороткой. После насыщения бумаги жидкостью полоску перемещали на специально изготовленную стойку с подножкой, установленную на столик электронных

весов марки HR-150AZ A&Company, Limited с точностью измерения 0.1 мг (общая масса). После взвешивания пробу (полоску бумаги) подвешивали на проволоку, натянутую между двумя стойками. Этот прием позволил исключить контакт проб с какой-либо поверхностью до полного их высыхания в подвешенном состоянии на воздухе. Подготовленные таким образом пробы сыворотки крови, мышц, печени и мозга высушивали в сушильном шкафу при температуре 105°C. Через неделю пробы по очереди доставали из шкафа и быстро взвешивали в горячем состоянии (горячая проба). Затем не менее недели пробы находились в помещении, впитывая влагу до определенной постоянной массы (влажная проба). Тотальную фракцию воды определяли по разности между общей массой и горячей пробой, свободную долю воды – по разности между общей массой и влажной пробой. Связанная фракция – это разность между тотальной и свободной фракциями воды. Методика определения данных фракций воды в организме и тканях гидробионтов изложена ранее (Мартемьянов, 2014). Содержание разных фракций воды в тканях выражали в процентах. Фракция свободной воды в биологических жидкостях является растворителем для осмотически активных веществ, поэтому Osm_{inorg} выражали в мОсм/кг свободной воды, а содержание натрия и калия – в ммоль/кг свободной воды. Показано, что Osm_{inorg} биологических жидкостей является адекватной только при ее расчетах на определенное количество свободной воды (Мартемьянов, 2014).

Сухие пробы помещали в пластиковые пробирки, в которые добавляли по 10 мл дистиллированной воды. Через сутки пробы встряхивали и определяли общую концентрацию ионов кондуктометрическим методом (Хлебович, 1974). Затем измеряли концентрацию натрия и калия на плазменном спектрофотометре Flapho-4 (фирма Carl Zeiss, Jena, Германия).

Результаты представлены как средние значения и их ошибки. Достоверность различий оценивали с помощью коэффициента Стьюдента при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В пробах морской воды, взятых 14.10.2016 г. и 02.05.2017 г. в зал. Восток Японского моря, Osm_{inorg} составляла 833 и 900 мОсм/л, а содержание натрия составляло 442 и 473 ммоль/л соответственно. В пробах воды, взятой 03.11.2016 г. в р. Раздольная и 03.05.2017 г. в р. Волчанка, Osm_{inorg} составляла 200 и 38 мОсм/л, а содержание натрия составляло 67.2 и 9.8 ммоль/л соответственно.

Osm_{inorg} в сыворотке, мышцах, печени и мозге крупночешуйной красноперки, отловленной в середине октября 2016 г. в море (IV стадия зрело-

Таблица 1. Показатели осмотической концентрации, содержание натрия, калия, свободной и связанной фракций воды в тканях и органах производителей дальневосточной краснопёрки *Tribolodon hakonensis*, отловленной в Японском море и в реках

Дата	Место отлова; стадия зрелости гонад	n	Проба	Osm _{ткань} , мОсм/кг свободной воды	Концентрация ионов, ммоль/кг свободной воды		Вода, %		
					натрий	калий	общая	свободная	связанная
14.10.2016	Японское море,	8	Сыворотка	394.4 ± 7.9	197.6 ± 4.0	4.8 ± 0.5	93.8 ± 0.5	93.3 ± 0.5	0.42 ± 0.02
	зал. Восток,	6	Мышцы	396.7 ± 5.4	52.0 ± 2.5	171.8 ± 8.0	70.8 ± 1.1	70.0 ± 1.2	0.76 ± 0.07
	42.89° N, 132.73° E;	6	Печень	383.7 ± 8.8	46.9 ± 2.8	143.8 ± 6.0	65.8 ± 1.6	65.5 ± 1.6	0.30 ± 0.07
	IV	6	Мозг	384.2 ± 4.3	72.4 ± 1.5	118.4 ± 1.4	74.9 ± 0.2	74.7 ± 0.2	0.19 ± 0.03
03.11.2016	Р. Раздольная,	13	Сыворотка	357.5 ± 4.8	177.9 ± 2.3	4.9 ± 0.2	94.1 ± 0.4	93.6 ± 0.4	0.46 ± 0.05
	43.29° N, 131.82° E;	3	Мышцы	314.1 ± 3.9*	18.6 ± 1.3	135.1 ± 3.9	79.2 ± 0.2	78.7 ± 0.2	0.54 ± 0.03
	IV	3	Печень	286.6 ± 7.3*	49.8 ± 7.2	86.8 ± 2.6	73.0 ± 0.8	72.7 ± 0.8	0.32 ± 0.01
		3	Мозг	311.6 ± 4.1*	74.1 ± 3.0	88.1 ± 1.2	77.7 ± 0.7	77.4 ± 0.7	0.30 ± 0.03
02.05.2017	Японское море,	8	Сыворотка	436.7 ± 10.2	223.9 ± 7.8	4.1 ± 0.2	96.9 ± 0.5	93.6 ± 0.4	3.27 ± 0.12
	зал. Восток,	6	Мышцы	349.4 ± 12.4*	42.8 ± 2.0	131.9 ± 5.3	74.5 ± 0.3	72.3 ± 0.2	2.16 ± 0.07
	42.89° N, 132.73° E;	6	Печень	355.4 ± 11.8*	57.7 ± 3.9	120.6 ± 5.8	74.1 ± 0.4	72.2 ± 0.4	1.95 ± 0.08
	V	6	Мозг	347.7 ± 7.6*	79.0 ± 5.2	90.4 ± 4.0	77.0 ± 0.7	75.8 ± 0.8	1.34 ± 0.07
03.05.2017	Р. Волчанка,	18	Сыворотка	355.2 ± 8.1	178.0 ± 4.5	4.7 ± 0.1	95.0 ± 0.4	91.3 ± 0.4	3.76 ± 0.14
	42.91° N, 132.72° E;	6	Мышцы	236.8 ± 7.4*	24.0 ± 1.3	93.5 ± 2.6	78.7 ± 0.4	76.7 ± 0.4	1.98 ± 0.04
	VI–II	6	Печень	251.8 ± 9.9*	42.0 ± 1.1	82.2 ± 5.4	76.0 ± 0.6	74.3 ± 0.7	2.67 ± 0.08
		6	Мозг	237.3 ± 10.7*	58.4 ± 4.4	58.6 ± 1.8	80.5 ± 0.4	79.4 ± 0.4	1.12 ± 0.02

Примечание. n – количество рыб; Osm_{ткань} – осмоляльность, обусловленная неорганическими ионами. *Отличия от сыворотки достоверны при p ≤ 0.05.

сти гонад), достоверно не различалась и в среднем составляла 389.5 ± 3.9 мОсм/кг свободной воды (табл. 1). По сравнению с данным показателем у красноперки из моря, у рыб с этой же стадией зрелости гонад, но отловленных в ноябре в р. Раздольная, Osm_{inorg} в сыворотке крови, мышцах, печени и мозге была ниже соответственно на 36.9, 82.6, 97.1 и 72.6 мОсм/кг свободной воды. Содержание натрия в сыворотке у рыб из р. Раздольная было меньше на 19.7 ммоль/кг свободной воды, натрия и калия в мышцах — на 33.4 и 36.7 ммоль/кг свободной воды соответственно, а калия в печени и мозге — на 57 и 30.3 ммоль/кг свободной воды соответственно. По сравнению с Osm_{inorg} в сыворотке крови, этот показатель в мышцах, печени и мозге рыб, отловленных в р. Раздольная, был достоверно ниже соответственно на 43.4, 70.9 и 45.9 мОсм/кг свободной воды.

У рыб, отловленных в мае 2017 г. в Японском море (V стадия зрелости гонад), Osm_{inorg} в мышцах, печени и мозге была достоверно ниже, чем в сыворотке крови соответственно на 87.3, 81.3 и 89 мОсм/кг свободной воды. У рыб, отловленных в мае этого же года в р. Волчанка (VI–II стадии зрелости гонад), Osm_{inorg} в сыворотке крови составляла 355.2 мОсм/кг свободной воды, т.е. этот показатель был на 81.5 мОсм/кг ниже, чем у рыб из моря, а содержание натрия у них снизилось на 45.5 ммоль/кг свободной воды. По сравнению с красноперкой из моря, у рыб из реки Osm_{inorg} в мышцах, печени и мозге снизилась соответственно на 112.6, 103.6 и 110.4 мОсм/кг свободной воды. Содержание натрия и калия в мышцах этих рыб уменьшилось соответственно на 18.8 и 38.4 ммоль/кг свободной воды, в печени — на 15.7 и 38.4 ммоль/кг свободной воды, а в мозге — на 20.6 и 31.8 ммоль/кг свободной воды. В мышцах, печени и мозге рыб, отловленных в р. Волчанка, Osm_{inorg} была достоверно ниже, чем в сыворотке крови, соответственно на 118.4, 103.4 и 117.9 мОсм/кг свободной воды (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

Osm_{inorg} и содержание натрия в сыворотке крови дальневосточной крупночешуйной красноперки, отловленной в море (табл. 1), были существенно ниже, чем во внешней среде. С одной стороны, это показывает, что в морской среде красноперка осуществляет гипоосмотический и гипонатремический типы регуляции, характерные для морских видов рыб (Мартемьянов, 2013). С другой стороны, Osm_{inorg} и содержание натрия в сыворотке крови рыб, пойманных в реках (табл. 1), были существенно выше, чем во внешней среде. Следовательно, в речной воде красноперка осуществляет гиперосмотический и гипернатремический типы регуляции, которые характерны для пресноводных видов рыб (Мартемьянов, 2013).

Таким образом, дальневосточная крупночешуйная красноперка обладает структурами и системами, которые в зависимости от солёности среды осуществляют пресноводный или морской тип осмотической и ионной регуляции. Пресноводным и морским типами осмотической и ионной регуляции одновременно обладают эвригалинные виды рыб (Мартемьянов, 2013). Следовательно, дальневосточная крупночешуйная красноперка по отношению к солёности среды является эвригалинным видом.

Osm_{inorg} в сыворотке крови дальневосточной крупночешуйной красноперки, пойманной в пресной воде, в среднем составляла 356.3 мОсм/кг (11.6 г/л), а у рыб из моря — 415.5 мОсм/кг (13.6 г/л). Эти результаты указывают на то, что у дальневосточной крупночешуйной красноперки в диапазоне солёности пресная вода — 11.6 г/л функционируют ионоциты пресноводного типа регуляции, поддерживая более высокие Osm_{inorg} и содержание натрия в сыворотке крови по сравнению с таковыми во внешней среде. При солёности 13.6 г/л и выше функционируют ионоциты морского типа регуляции, поддерживающие более низкие показатели Osm_{inorg} и содержание натрия в сыворотке крови по сравнению с таковыми во внешней среде. Переход с одного типа регуляции на другой у дальневосточной крупночешуйной красноперки происходит в диапазоне солёности 11.6–13.6 г/л.

Osm_{inorg} в сыворотке крови, мышцах, печени и мозге крупночешуйной красноперки с гонадами IV стадии зрелости, отловленной в середине октября 2016 г. в море, достоверно не различалась (Osm_{inorg} сыворотки = Osm_{inorg} тканей). В сыворотке крови и тканях организма также присутствуют органические осмолиты. В данном случае, чтобы соблюдалось общее осмотическое равновесие между внутренней средой и внутриклеточной жидкостью, количество органических осмолитов в сыворотке крови и тканях организма должно быть равным (Osm_{org} сыворотки = Osm_{org} тканей). Аналогичный тип регуляции общей осмольности (Osm_{total}) выявлен у карася *Carassius auratus*, акклиматизированного к пресной воде (Мартемьянов, Васильев, 2018).

Osm_{inorg} в сыворотке крови дальневосточной крупночешуйной красноперки была существенно выше, чем в мышцах, печени и мозге рыб (Osm_{inorg} сыворотки > Osm_{inorg} тканей), отловленных в море перед заходом в р. Волчанка на нерест (V стадия зрелости гонад), в реках после нереста (VI–II стадия зрелости гонад) и в период зимовки (IV стадия зрелости гонад). Чтобы соблюдалось общее осмотическое равновесие между внеклеточной и внутриклеточной жидкостью (Osm_{total} сыворотки = Osm_{total} тканей), количество органических осмолитов в тканях организма должно компенсировать недостаток электролитов плюс органические молекулы внутренней среды.

В данном случае Osm_{org} тканей $> Osm_{org}$ сыворотки. Такой тип регуляции Osm_{total} зарегистрирован у трески *Gadus morhua*, отловленной в Белом море (Мартемьянов, 2020).

Поддержание структуры и функции макромолекул (в том числе белков), совместимых с жизнедеятельностью клетки, может осуществляться только в узких диапазонах внутриклеточной концентрации неорганических ионов (Somero, 1986). Внутриклеточное накопление электролитов для компенсации Osm_{inorg} внутренней среды ограничено (Martemyanov, Poddubnaya, 2019). В связи с этим более высокую Osm_{inorg} внутренней среды клетки организма дополнительно компенсируют за счет накопления органических молекул.

Показано, что при перемещении эвригалинных рыб из пресной в морскую воду повышается осмоляльность внутренней среды на определенную величину за счет ионов натрия и хлора (Fugelli, Zachariassen, 1976; Ahokas, Sorg, 1977; Vislie, 1980). Приспособление клеток организма к повышению осмоляльности внутренней среды осуществляется за счет накопления преимущественно ионов натрия, калия и хлора до концентраций, не оказывающих вредного эффекта на внутриклеточные процессы. При недостатке электролитов клетки организма используют органические осмолиты для достижения осмотического равновесия с внутренней средой.

При акклимации тилапии *Oreochromis mossambica* к морской воде отмечено усиление экспрессии гена, кодирующего переносчик таурина в разных тканях организма. Это приводило к увеличению количества молекул белка-переносчика на мембранах и к активации поглощения аминокислоты таурина из внутренней среды в клетки (Takeuchi et al., 2001). У рыб данного вида, акклимированных к морской среде, содержание свободных аминокислот в мышцах, печени, жабрах, сердце и почках увеличивалось в среднем в 2 раза за счет распада белков (Venkatachari, 1974). При адаптации угря *Anguilla anguilla* (см.: Huggins, Colley, 1971), камбалы *Platichthys flesus* и трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* (см.: Lange, Fugelli, 1965), мозамбикской тилапии *Sarotherodon mossambicus* (см.: Assem, Hanke, 1983) и фундулюса *Fundulus diaphanus* (см.: Ahokas, Sorg, 1977) к морской воде происходило существенное увеличение концентрации свободных аминокислот в мышцах. Адаптация эвригалинной камбалы *P. flesus* к морской воде сопровождалась повышением концентрации ионов калия и таурина в сердечной мышце (Vislie, 1980), а в эритроцитах – ионов калия, хлора и органических осмолитов таурина и гамма-аминомасляной кислоты (Fugelli, Zachariassen, 1976). При перемещении эвригалинных рыб бородачатой кефали *Crenimugil labrosus* и палтуса *Paralichthys lethostigma* из пресной воды в морскую содержание аминокислот в мышцах увеличивалось соответственно на 82 и 66% (Lasserre, Gilles, 1971).

У рыб в пресной воде Osm_{inorg} в плазме, мышцах, печени, спинномозговой жидкости и мозге не различалась (Мартемьянов, Васильев, 2018). В зоне критической солёности у пресноводных рыб повышалась осмоляльность внутренней среды за счет ионов натрия и хлора (Davis, Simco, 1976; Hegab, Hanke, 1982; Мартемьянов, 2013, 2017; Christensen et al., 2016; Мартемьянов, Васильев, 2018; Martemyanov, Poddubnaya, 2019). При этом степень увеличения Osm_{inorg} во внутренней среде организма была больше, чем в тканях. Так, при критической солёности 11.5 г/л Osm_{inorg} в плазме крови карася *Carassius auratus* повышалась за счет электролитов на 44.3%, а в эритроцитах, мышцах, печени, спинномозговой жидкости и мозге – на 20.6–36.3%. Недостаток электролитов в этих тканях компенсируется за счет накопления органических осмолитов. В мышцах и печени карпа при критической солёности отмечено повышение концентрации глицина, гистидина, аланина, таурина и глутамата (Hegab, Hanke, 1983). У жаб *Bufo viridis* и *B. boreas* в зоне критической солёности компенсация внутриклеточной осмотической концентрации мышц за счет органических веществ достигала соответственно 53 и 57% (Gordon, 1965).

Таким образом, у дальневосточной крупночешуйной красноперки в речной период независим от стадии зрелости гонад и в море перед нерестом Osm_{inorg} внутренней среды была на определенную величину выше, чем осмоляльность мышечной ткани, печени и мозга. Для соблюдения осмотического равновесия между внутренней средой и внутриклеточной жидкостью недостаток неорганических ионов в тканях организма красноперки должен компенсироваться за счет накопления органических осмолитов.

Полученные данные показывают, что степень различий между Osm_{inorg} внутренней среды и тканями организма зависит от физиологического состояния производителей. По отношению к внутренней среде Osm_{inorg} в мышцах, печени и мозге рыб, отловленных в период зимовки (IV стадия) в р. Раздольная, была ниже соответственно на 12.1, 19.8 и 12.8%, а у красноперки из р. Волчанка сразу после нереста (VI–II стадия) – соответственно на 33.3, 29.1 и 33.2%. Различия между Osm_{inorg} внутренней среды и тканей организма проявлялись более существенно у красноперки, отловленной после нереста в р. Волчанка. В период размножения наибольшие изменения показателей водно-солевого гомеостаза наблюдались также у пресноводных видов рыб (Мартемьянов, 2001, 2004; Martemyanov, 2015). Чрезмерное функционирование адаптивных систем во время нереста приводит к истощению защитных сил организма, снижая способность поддерживать параметры водно-солевого гомеостаза.

У производителей дальневосточной крупночешуйной красноперки перед нерестом (V стадия

зрелости гонад) и сразу после нереста (VI–II стадии зрелости гонад) доля связанной воды в сыворотке крови и тканях многократно увеличивалась (табл. 1). Это указывает на то, что в период размножения в организме производителей происходят существенные структурные перестройки, приводящие к образованию органических веществ, способных связывать воду.

В ходе миграции из Японского моря на зимовку в р. Раздольная у производителей дальневосточной крупночешуйной красноперки (IV стадия зрелости) Osm_{inorg} и содержание натрия в сыворотке крови снизились соответственно на 9.4 и 10% (табл. 1). Во время нерестовой миграции производителей с гонадами V стадии зрелости из моря в р. Волчанка осмоляльность и содержание натрия в сыворотке крови снизились соответственно на 18.7 и 20.5%. Следовательно, снижение Osm_{inorg} и содержания натрия во внутренней среде производителей в ходе нерестовой миграции из моря в реку более существенно (в 2 раза), чем при миграции рыб на зимовку из моря в реку.

В ответ на снижение осмоляльности внутренней среды при переходе рыб из моря в реки в клетках мышечной ткани красноперки снижалось содержание натрия и калия, а в клетках печени и мозга — лишь ионов калия. При этом величина снижения концентрации ионов в мышцах, печени и мозге была больше таковой в сыворотке крови, что создавало более низкую Osm_{inorg} в тканях. Чтобы обеспечить осмотическое равновесие с внутренней средой, ткани компенсировали дефицит неорганических ионов за счет накопления органических осмолитов.

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 госзадания (тема № АААА-А18-118012690101-2; № АААА-А19-119102890013-3) и при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-04-00120 а).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят ЦКП “Приморский океанариум” ННЦМБ ДВО РАН (г. Владивосток) за предоставление условий для сбора и первичной обработки биологического материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреева А.М., Ламаш Н.Е., Серебрякова М.В., Рябцева И.П. Сезонная динамика капиллярной фильтрации белков плазмы у дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* (Cyprinidae) // Вопр. ихтиологии. 2015а. Т. 55. № 5. С. 586–597.
- Андреева А.М., Серебрякова М.В., Ламаш Н.Е. и др. Особенности организации белков низкомолекулярной фракции плазмы у дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* и других Cyprinidae // Биол. моря. 2015б. Т. 41. № 1. С. 55–63.
- Гавренков Ю.И. Биология, морфология и состояние запасов дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* в южном Приморье // Изв. ТИНРО. 1998. Т. 123. С. 74–81.
- Гавренков Ю.И., Свиридов В.В. Экология размножения дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* в бассейнах рек Приморья // Чтения памяти В.Я. Леванидова. 2001. Вып. 1. С. 296–304.
- Мартемьянов В.И. Диапазоны регуляции концентрации натрия, калия, кальция, магния в плазме, эритроцитах и мышечной ткани плотвы *Rutilus rutilus* в природных условиях // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2001. Т. 37. С. 109–113.
- Мартемьянов В.И. Динамика содержания катионов в плазме, эритроцитах и мышечной ткани плотвы *Rutilus rutilus* L. в период размножения // Биол. внутр. вод. 2004. № 2. С. 78–84.
- Мартемьянов В.И. Оценка статуса рыб по отношению к солёности среды на основе типов осмотической и ионной регуляции // Тр. Зоол. ин-та РАН. Приложение № 3. 2013. С. 175–181.
- Мартемьянов В.И. Методы определения общей, свободной и связанной фракций воды в организме и тканях гидробионтов // Вода: химия и экология. 2014. № 2. С. 86–91.
- Мартемьянов В.И. Механизмы регуляции клеточного объема эритроцитов карпа *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) при повышении осмотической концентрации плазмы крови у рыб в зоне критической солёности // Вопр. ихтиологии. 2017. Т. 57. № 2. С. 223–229.
- Мартемьянов В.И. Показатели осмотической и ионной регуляции у рыб Белого моря // Вопр. ихтиологии. 2020. Т. 60. № 2. С. 209–219.
- Мартемьянов В.И., Васильев А.С. Регуляция объема эритроцитов, мышц, печени и мозга у караса *Carassius auratus* (Cyprinidae) в ответ на повышение осмотической концентрации в плазме крови // Вопр. ихтиологии. 2018. Т. 58. № 4. С. 478–485.
- Сакун О.Ф., Буцкая Н.А. Определение стадий зрелости и изучение половых продуктов рыб. Мурманск: ПИНРО. 1968. 46 с.
- Свиридов В.В. Морфологическая и генетическая дивергенция и географическая изменчивость дальневосточных красноперок рода *Tribolodon*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток: Дальневост. гос. ун-т. 2002. 21 с.
- Хлебович В.В. Критическая солёность биологических процессов. Л.: Наука. 1974. 236 с.
- Ahokas R.A., Sorg G. The effect of salinity and temperature on intracellular osmoregulation and muscle free amino acids in *Fundulus diaphanous* // Comp. Biochem. Physiol. Part A: Comp. Physiol. 1977. V. 56. P. 101–105. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(77\)90448-0](https://doi.org/10.1016/0300-9629(77)90448-0)
- Assem H., Hanke W. The significance of the amino acids during osmotic adjustment in teleost fish-I. Changes in

- the euryhaline *Sarotherodon mossambicus* // Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiology. 1983. V. 74. P. 531–536.
- Brykov V.A., Polyakova N.E., Semina A.V. Phylogeographic analysis reveals two periods of divergence in large-scaled redbfin *Tribolodon hakonensis* (Pisces, Cyprinidae) // Russ. J. Gen. 2011. V. 47. № 11. P. 1324–1332.
- Brykov V.A., Polyakova N.E., Semina A.V. Comparative analysis of mitochondrial DNA Variation in four species of Far Eastern redbfins of the genus *Tribolodon* (Pisces, Cyprinidae) // Russ. J. Gen. 2013. V. 49. № 3. P. 355–365.
- Davis K.B., Simco B.A. Salinity effects on plasma electrolytes of channel catfish, *Ictalurus punctatus* // J. Fish. Res. Board Can. 1976. V. 33. P. 741–746. <https://doi.org/10.1139/f76-091>
- Christensen E.A.F., Svendsen M.B.S., Steffensen J.F. Plasma osmolality and oxygen consumption of perch *Perca fluviatilis* in response to different salinities and temperatures // J. Fish Biol. 2016. V. 90. № 3. P. 834–846. <https://doi.org/10.1111/jfb.13200>
- Fugelli K., Zachariassen K.E. The distribution of taurine, gamma-aminobutyric acid and inorganic ions between plasma and erythrocytes in flounder (*Platichthys flesus*) at different plasma osmolalities // Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiology. 1976. V. 55. P. 173–177.
- Gordon M.S. Intracellular osmoregulation in skeletal muscle during salinity adaptation in two species of toads // Biol. Bull. 1965. V. 128. P. 218–229.
- Hegab S.A., Hanke W. Electrolyte changes and volume regulatory processes in the carp (*Cyprinus carpio*) during osmotic stress // Comp. Biochem. Physiol. 1982. V. 71A. P. 157–164.
- Hegab S.A., Hanke W. The significance of the amino acids during osmotic adjustment in teleost fish. II. Changes in the stenohaline *Cyprinus carpio* // Comp. Biochem. Physiol. 1983. V. 74A. P. 537–543.
- Huggins A.K., Colley L. The changes in the non-protein nitrogenous constituents of muscle during the adaptation of the eel *Anguilla anguilla* L. from fresh water to sea water // Comp. Biochem. Physiol. 1971. V. 38B. P. 537–541.
- Lange R., Fugelli K. The osmotic adjustment in the euryhaline teleosts, the flounder, *Pleuronectes flesus* L. and the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. // Comp. Biochem. Physiol. 1965. V. 15. P. 283–292.
- Lasserre P., Gilles R. Modification of the amino acid pool in the parietal muscle of two euryhaline teleosts during osmotic adjustment // Experientia. 1971. V. 27. № 12. P. 1434–1435.
- Martemyanov V.I. Stress reaction in freshwater fish in response to extreme impacts and during the reproduction period // J. Coastal Life Med. 2015. V. 3. № 3. P. 169–177.
- Martemyanov V.I., Poddubnaya N.Y. Volume regulation of muscle cells in the carp *Cyprinus carpio* in response to hypernatremia // Bratisl. Lek. Listy. 2019. V. 120. № 1. P. 52–57. https://doi.org/10.4149/BLL_2019_008
- Somero G.N. Protons, osmolytes, and fitness of internal milieu for protein function // Amer. J. Physiol. 1986. V. 251. P. R197–R213.
- Takeuchi K., Toyohara H., Kinoshita M., Sakaguchi M. Ubiquitous increase in taurine transporter mRNA in tissues of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during high-salinity adaptation // Fish Physiol. Biochem. 2001. V. 23. P. 173–182. <https://doi.org/10.1023/A:1007889725718>
- Venkatachari S.A.T. Effect of salinity adaptation on nitrogen metabolism in the freshwater fish *Tilapia mossambica*. I. Tissue protein and amino acid levels // Mar. Biol. 1974. V. 24. P. 57–63.
- Vislie T. Hyper-osmotic cell volume regulation in vivo and in vitro in flounder (*Platichthys flesus*) heart ventricles // J. Comp. Physiol. 1980. V. 140. № 3. P. 185–191.

Osmotic and Ionic Regulation in the Far Eastern Big-Scaled Redfin *Tribolodon hakonensis* (Günther, 1877) (Cypriniformes: Cyprinidae) in the Sea and in Rivers

V. I. Martemyanov^a, N. E. Lamash^{a, b}, and A. M. Andreeva^a

^aI.D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, Borok 152742, Russia

^bA.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

The values of the osmolality, the contents of sodium, potassium, as well as the contents of total, free, and bound water fractions in blood serum, muscles, liver and brain, characteristic for fish in the sea and in rivers were determined for the far eastern big-scaled redbfin, *Tribolodon hakonensis*. The osmolality associated with the content of inorganic ions (Osm_{inorg}) was the same in the internal environment (blood serum), in muscles, liver and brain of the redbfins caught in the sea at the gonad maturity stage IV. In fish caught in the sea in pre-spawning period (gonad maturity stage V) and in rivers after spawning (gonad maturity stage VI–II) or in wintering period (gonad maturity stage IV), Osm_{inorg} in muscles, liver and the brain was significantly lower than in the blood serum. To achieve osmotic equilibrium with the internal environment, the lack of electrolytes in body tissues was compensated by accumulation of organic osmolytes. Migration of the redbfin from rivers to the sea was associated with a significant increase in Osm_{inorg} in the blood serum, by 9.4–18.7% on the average. As an adaptation in response to this increase, muscle tissue cells increased the concentration of sodium and potassium, while liver and brain cells accumulated potassium.

Keywords: serum, muscles, liver, brain, osmolality, sodium, potassium, total, free, and bound water fractions

УДК 597.556.331.9:577.125

СОСТАВ ЛИПИДОВ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В КРОВИ И ВО ВНУТРЕННИХ ОРГАНАХ АНТАРКТИЧЕСКОГО КЛЫКАЧА *DISSOSTICHUS MAWSONI* NORMAN, 1937 (NOTOTHENIIDAE)

© 2021 г. Д. В. Микряков^{1, *}, И. И. Гордеев^{2, 3}, В. Р. Микряков¹

¹Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,
пос. Борок 152742, Россия

²Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии,
Москва 107140, Россия

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Москва 119991, Россия

*e-mail: daniil@ibiw.ru

Поступила в редакцию 18.03.2020 г.

После доработки 09.09.2020 г.

Принята к публикации 05.10.2020 г.

У обитающего в стабильно холодных водах Антарктики антарктического клыкача *Dissostichus mawsoni* Norman, 1937 (Actinopterygii: Nototheniidae) определены содержание общих липидов и их фракций, интенсивность окислительных процессов и уровень антиокислительной защиты в крови, почке, селезенке и печени в зависимости от пола и возраста. Существенных различий между самцами и самками по этим показателям не выявлено. Значимые различия некоторых показателей у разновозрастных групп клыкача отмечены в крови и печени. Однако большинство показателей различались незначительно, что, вероятно, связано с отловом рыб в нагульный период. Высокое содержание общих липидов, запасных триацилглицеридов и уровень антиокислительной защиты в крови и органах *D. mawsoni* отражают особенности данного вида, обеспечивающие обитание в условиях Антарктики.

Ключевые слова: антарктический клыкач *Dissostichus mawsoni*, кровь, почка, селезенка, печень, липиды и их фракции, перекисное окисление липидов, антиокислительная активность

DOI: 10.31857/S0134347521030098

Представители семейства Нототениевые (Nototheniidae) – это в основном донные и придонные рыбы, обитающие в Антарктике и Субантарктике (Шуст, 1998; Nelson, 2006). Обитание в холодных водах отразилось на анатомии и физиологии данных рыб. Например, отсутствие плавательного пузыря, который имеется у других лучепёрых рыб, компенсируется особенностями общей морфологии тела, которые обеспечивают его плавучесть. Снижение массы тела происходит за счет обводнения мышц и образования липидных мешков – своеобразных внутримышечных жировых депо, а также в результате уменьшения минерализации костей и редукции костных элементов скелета. У большинства эндемиков антарктических вод в крови и других жидкостях тела содержатся особые гликопротеины – биологические антифризы, препятствующие образованию кристаллов льда в организме (DeVries, 1971; Chen et al., 1977; Морской энциклопедический ..., 1986; Nelson, 2006).

Один из самых крупных и наиболее ценных промысловых видов семейства Нототениевые в Антарктике и Субантарктике – антарктический клыкач *Dissostichus mawsoni* Norman, 1937. Этот вид распространен циркумполярно, ареал обитания включает зоны континентального шельфа, склона, а также отдельно стоящих подводных поднятий и островов в Южном океане. Возраст отдельных особей клыкача может достигать 30 лет и более, длина – 2 м, а масса – 120 кг. Питается *D. mawsoni* разными видами кальмаров и рыб (Шуст, 1998; Промысловые рыбы России, 2006; Петров и др., 2014).

В полярных регионах липиды и жирные кислоты представляют собой основные энергетические запасы для многих видов рыб и играют важную роль в росте, движении, балансе плавучести и воспроизводстве (Лапин, Шатуновский, 1981; Гершанович и др., 1991; Sargent et al., 2002). Опубликованы сведения о количестве и составе общих липидов и жирных кислот, а также о процентном содержании некоторых липидных фракций у

Таблица 1. Морфометрические показатели антарктического клыкача *Dissostichus mawsoni*

Показатель	Пол		Возраст, лет			
	самки	самцы	6–7	8–11	12–13	14 и старше
Средняя масса, г	21710 ± 3217	21848 ± 2197	8549 ± 310	18483 ± 1669	22465 ± 1117	36149 ± 2286
Средняя длина, см	115 ± 6.48	115 ± 4.01	86.75 ± 1.29	106.78 ± 2.01	121.4 ± 1.41	141.22 ± 2.71

взрослых особей и личинок полярных видов рыб, в том числе у представителей *Nototheniidea*; приведены сравнительные характеристики липидного состава в зависимости от образа жизни и пищевых предпочтений рыб (Hagen et al., 2002; Mauzaud et al., 2011; Giraldo et al., 2015, 2017; Пекоева и др., 2017; Murzina et al., 2020). У рыб, обитающих в условиях антарктических вод, энергетический обмен обеспечивается жировыми ресурсами организма. Например, у мраморной нототении *Notothenia rossii* Richardson, 1844 обнаружено высокое содержание высоконасыщенных жирных кислот, активно участвующих в окислительных процессах (Шатуновский, 1980). Вследствие этого в тканях и органах повышается содержание свободных радикалов или активных форм кислорода (АФК), которые участвуют в процессах клеточного метаболизма. Высокий уровень АФК негативно влияет на клетки и нарушает динамическое равновесие окислительно-восстановительного баланса. Подобное избыточное накопление АФК нейтрализуется ферментными и неферментными антиоксидантами (Меньшикова и др., 2008). Несмотря на понимание общей концепции, сведения об уровне липидов, окислительных процессах и о содержании антиоксидантов у представителей глубоководной ихтиофауны Антарктики и Субантарктики до сих пор отрывочны.

В настоящей работе исследованы содержание общих липидов и их фракций, а также интенсивность окислительных процессов и уровень антиоксидантов в крови и органах антарктического клыкача.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Особи антарктического клыкача *Dissostichus mawsoni* (36 экз.) были выловлены в декабре 2011 г. – январе 2012 г. в море Росса (Тихоокеанский сектор Антарктики; 75°11' ю.ш., 175°31' з.д.) на глубине от 1241 до 1625 м ярусоловом “Янтарь-31” (ООО “Орион”, г. Хабаровск), а также в январе–марте 2013 г. в море Росса (75° ю.ш., 172–174° в.д.) на глубине от 826 до 1273 м и в море Амундсена (69°41' ю.ш., 126°46' з.д.) на глубине от 1398 до 1430 м ярусоловом “Янтарь-35” (ООО “Орион”, г. Хабаровск) при помощи донного яруса типа автотайп “Мустанд” (Петров и др., 2014).

Сравнительный анализ отловленных рыб проводили по половому признаку и возрасту. Всего было обработано 23 самца и 13 самок (табл. 1). От-

ловленных рыб разделили на четыре возрастные группы: 6–7 лет (5 самцов и 3 самки – неполовозрелые), 8–11 лет (6 самцов и 3 самки), 12–13 лет (7 самцов и 3 самки) и старше 14 лет (5 самцов и 4 самки).

Сразу после вылова у рыб отбирали кровь из хвостовой вены и вынимали печень, почку и селезенку. Индекс этих внутренних органов рассчитывали по процентному отношению массы исследуемого органа к массе рыбы по формуле: $X = A/B \times 100$, где X – индекс органа, %; A – масса органа, г; B – масса рыбы, г. Кровь центрифугировали до осаждения клеточных элементов и отделения сыворотки. Пробирки с сывороткой крови и образцами тканей органов замораживали при температуре -20°C . В условиях лаборатории из размороженных образцов тканей печени, почки и селезенки при помощи гомогенизатора готовили гомогенаты с 0.65% физиологическим раствором в соотношении 1 : 5.

В сыворотке крови и гомогенатах тканей рыб анализировали содержание общих липидов (ОЛ) и их фракционный состав, интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и уровень антиокислительной защиты (АЗ).

Липиды из тканей экстрагировали и определяли гравиметрически стандартным методом по Фолчу (Folch et al., 1957). Пробы фиксировали смесью хлороформ : метанол в соотношении 2 : 1 по объему. Разделение общих липидов проводили с помощью метода тонкослойной хроматографии восходящим способом на пластинках “Silufol” в системе растворителей петролейный эфир : серный эфир : ледяная уксусная кислота (90 : 10 : 1 по объему). Фракционный состав липидов определяли в герметичной камере в парах йода (Кейтс, 1975). Определяли относительное содержание структурных фосфолипидов (ФЛ), холестерина (ХС), неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК), запасных триацилглицеридов (ТГ), эфиров стеринов (ЭС) и углеводов + воска (УВ).

Интенсивность ПОЛ определяли по накоплению малонового диальдегида (МДА) – одного из конечных продуктов перекисного окисления. Концентрацию МДА устанавливали по количеству продуктов ПОЛ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой и дающих с ней окрашенный комплекс. Интенсивность окрашивания оценивали спектрофотометрически по изменению максимума поглощения при 532 нм (Андреева и др., 1988). Содержание МДА вычисляли с учетом ко-

Таблица 2. Соматические индексы, содержание липидов и их фракций, интенсивность окислительных процессов и уровень антиокислительной защиты в крови и органах самок и самцов антарктического клыкча *Dissostichus mawsoni*

Показатель	Кровь	Почка	Селезенка	Печень
Соматический индекс, %	—	0.21 ± 0.02 0.22 ± 0.02	0.53 ± 0.32 0.20 ± 0.02	2.98 ± 0.36 2.22 ± 0.26
ОЛ, мг%	1363 ± 19 1349 ± 8	2793 ± 26 2844 ± 14	1887 ± 11 1904 ± 7	3632 ± 26 3595 ± 28
ФЛ, %	36.50 ± 0.20 36.10 ± 0.13	35.19 ± 0.08 35.06 ± 0.19	48.18 ± 0.12 47.87 ± 0.15	38.25 ± 0.14 38.23 ± 0.08
ХС, %	10.79 ± 0.19 10.95 ± 0.09	15.07 ± 0.08 15.18 ± 0.14	8.62 ± 0.11 8.64 ± 0.10	9.95 ± 0.13 10.03 ± 0.13
НЭЖК, %	6.28 ± 0.38 6.43 ± 0.22	3.08 ± 0.15 3.01 ± 0.13	2.73 ± 0.03 2.57 ± 0.13	3.44 ± 0.06 3.46 ± 0.08
ТГ, %	40.07 ± 0.34 40.34 ± 0.33	39.87 ± 0.11 40.07 ± 0.16	34.96 ± 0.18 35.37 ± 0.13	42.35 ± 0.37 42.48 ± 0.22
ЭС, %	4.89 ± 0.14 4.77 ± 0.11	6.21 ± 0.07 6.08 ± 0.05	4.67 ± 0.05 4.72 ± 0.06	4.64 ± 0.11 4.58 ± 0.11
УВ, %	1.34 ± 0.06 1.39 ± 0.04	0.56 ± 0.04 0.57 ± 0.01	0.81 ± 0.03 0.80 ± 0.07	1.35 ± 0.11 1.18 ± 0.03
МДА, нмоль/г	1.99 ± 0.07 2.07 ± 0.06	10.68 ± 0.42 11.11 ± 0.34	2.36 ± 0.05 2.12 ± 0.07	6.70 ± 0.11 6.67 ± 0.10
КОС, л/(мл мин)	1.43 ± 0.09 1.50 ± 0.06	4.17 ± 0.07 4.15 ± 0.05	1.27 ± 0.02 1.24 ± 0.02	2.82 ± 0.10 2.72 ± 0.09

Примечание. Над чертой – показатели самок, под чертой – самцов; “—” – не определяли; расшифровка аббревиатур приведена в тексте.

эффицента молярной экстинкции: $1.56 \times 10^5 / (\text{М см})$ и выражали в наномолях на 1 г ткани.

Об общей антиокислительной активности судили по кинетике окисления субстрата восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола кислородом воздуха, оцененной по общепринятой методике (Семенов, Ярош, 1985). Суть данного метода: чем выше скорость окисления субстрата в присутствии биологического материала, тем ниже содержание антиоксидантов в тканях. Константу ингибирования окисления субстрата (КОС), которая служит показателем антиокислительной активности ткани, определяли относительно контроля по формуле: $K_i = K_{\text{кон}} - K_{\text{оп}}/C$, где $K_{\text{кон}}$ и $K_{\text{оп}}$ – константы скорости окисления субстрата соответственно в контроле и опыте; C – концентрация биологического материала в кювете.

Статистическую обработку результатов исследования проводили по стандартным алгоритмам, реализованным в пакете программ Statistica v6.0, с использованием t -теста. Различия считали значимыми при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При сравнении соматических индексов почки, селезенки и печени самцов и самок *Dissostichus*

mawsoni (табл. 2) достоверных различий не обнаружено. И у самцов, и у самок антарктического клыкча наибольшим был гепатосоматический индекс, а наименьшим – спленосоматический. Между полами не обнаружено различий и в содержании липидов. Однако в разных органах содержание липидов различалось: самые высокие значения НЭЖК и УВ определены в крови; ХС, ЭС, МДА и КОС – в почке; ФЛ – в селезенке, а ОЛ и ТГ – в печени. Самыми низкими значениями ОЛ и МДА были в крови, ФЛ и УВ – в почке; ХЛ, НЭЖК, ТГ и КОС – в селезенке, а ЭС – в печени.

При сравнении разных возрастных групп самый низкий соматический индекс почки и селезенки выявлен у рыб старших возрастных групп (табл. 3). Наибольшее количество достоверных отличий по всем показателям отмечено в крови, а наиболее вариабельным оказался уровень ФЛ в разных тканях и органах. Больше всего различий между исследованными показателями выявлено у рыб старше 14 лет.

ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ полученных результатов показал значимые различия между разновозрастными особями. Более низкие соматические

Таблица 3. Соматические индексы, содержание липидов и их фракций, интенсивность окислительных процессов и уровень антиокислительной защиты в крови и органах разновозрастных групп антарктического клыкача *Dissostichus mawsoni*

Возраст, лет	Соматический индекс, %			
	кровь	почка	селезенка	печень
6–7 (а)	–	0.36 ± 0.03	0.29 ± 0.04	2.15 ± 0.18
8–11 (б)	–	0.22 ± 0.01 ^а	0.68 ± 0.47	3.12 ± 0.55
12–13 (в)	–	0.18 ± 0.01 ^а	0.16 ± 0.01 ^а	2.34 ± 0.40
Старше 14	–	0.14 ± 0.01 ^{а,б}	0.16 ± 0.02 ^а	2.37 ± 0.39
ОЛ, мг %				
6–7 (а)	1427 ± 23	2798 ± 13	1883 ± 18	3640 ± 45
8–11 (б)	1394 ± 12	2870 ± 20	1898 ± 13	3635 ± 55
12–13 (в)	1393 ± 27	2803 ± 23	1906 ± 9	3599 ± 29
Старше 14	1433 ± 28	2860 ± 10	1883 ± 8	3590 ± 65
ФЛ, %				
6–7 (а)	35.74 ± 0.18	35.15 ± 0.09	47.98 ± 0.27	37.91 ± 0.04
8–11 (б)	35.85 ± 0.14	35.36 ± 0.14	47.67 ± 0.12	38.31 ± 0.20
12–13 (в)	36.21 ± 0.16	35.01 ± 0.22	47.99 ± 0.18	38.26 ± 0.10
Старше 14	35.39 ± 0.11 ^{б, в}	35.15 ± 0.28	48.40 ± 0.06 ^б	38.45 ± 0.03 ^а
ХС, %				
6–7 (а)	10.43 ± 0.19	15.19 ± 0.12	8.84 ± 0.18	9.94 ± 0.11
8–11 (б)	10.31 ± 0.14	14.93 ± 0.04	8.76 ± 0.35	10.35 ± 0.21
12–13 (в)	10.54 ± 0.17	15.20 ± 0.15	8.56 ± 0.09	10.03 ± 0.12
Старше 14	10.40 ± 0.28	15.12 ± 0.26	8.52 ± 0.03	9.64 ± 0.20
НЭЖК, %				
6–7 (а)	6.21 ± 0.10	2.77 ± 0.26	2.78 ± 0.06	3.32 ± 0.08
8–11 (б)	6.90 ± 0.22 ^а	2.69 ± 0.36	2.80 ± 0.11	3.59 ± 0.31
12–13 (в)	6.53 ± 0.19	3.23 ± 0.09	2.51 ± 0.14	3.42 ± 0.06
Старше 14	6.92 ± 0.36 ^а	3.10 ± 0.15	2.75 ± 0.01	3.57 ± 0.09
ТГ, %				
6–7 (а)	41.62 ± 0.32	40.10 ± 0.12	35.04 ± 0.46	43.12 ± 0.08
8–11 (б)	41.12 ± 0.36	40.34 ± 0.53	35.44 ± 0.46	41.85 ± 0.34
12–13 (в)	40.55 ± 0.39	39.85 ± 0.11	35.31 ± 0.12	42.50 ± 0.30
Старше 14	41.20 ± 0.13	39.96 ± 0.30	34.83 ± 0.33	42.11 ± 0.26
ЭС, %				
6–7 (а)	4.37 ± 0.11	6.28 ± 0.19	4.57 ± 0.02	4.55 ± 0.26
8–11 (б)	4.21 ± 0.17	6.06 ± 0.08	4.61 ± 0.05	4.74 ± 0.15
12–13 (в)	4.73 ± 0.12 ^б	6.15 ± 0.06	4.79 ± 0.05	4.54 ± 0.11
Старше 14	4.25 ± 0.04 ^в	6.03 ± 0.06	4.67 ± 0.13	4.75 ± 0.32
УВ, %				
6–7 (а)	1.56 ± 0.09	0.49 ± 0.02	0.78 ± 0.07	1.15 ± 0.03
8–11 (б)	1.60 ± 0.06	0.61 ± 0.02	0.70 ± 0.06	1.15 ± 0.13
12–13 (в)	1.44 ± 0.03 ^б	0.56 ± 0.01	0.85 ± 0.07	1.24 ± 0.04
Старше 14	1.83 ± 0.20 ^в	0.63 ± 0.07	0.81 ± 0.12	1.47 ± 0.32

Таблица 3. Окончание

Возраст, лет	Соматический индекс, %			
	кровь	почка	селезенка	печень
МДА, нмоль/г				
6–7 (а)	2.13 ± 0.09	11.03 ± 0.50	2.20 ± 0.16	6.34 ± 0.17
8–11 (б)	1.98 ± 0.07	11.16 ± 0.60	2.11 ± 0.12	6.50 ± 0.13
12–13 (в)	1.92 ± 0.11	10.27 ± 0.56	2.28 ± 0.05	6.98 ± 0.05 ^{а, б}
Старше 14	2.16 ± 0.07	11.3 ± 0.47	2.25 ± 0.08	6.84 ± 0.13 ^а
КОС, л/(мл мин)				
6–7 (а)	1.43 ± 0.06	4.15 ± 0.08	1.22 ± 0.04	2.78 ± 0.15
8–11 (б)	1.48 ± 0.11	4.11 ± 0.07	1.28 ± 0.04	2.51 ± 0.12
12–13 (в)	1.35 ± 0.11	4.07 ± 0.09	1.27 ± 0.02	3.00 ± 0.12 ^б
Старше 14	1.68 ± 0.08 ^{а, б}	4.30 ± 0.07	1.22 ± 0.04	2.73 ± 0.12

^{а, б, в}Значимые различия между разными возрастными группами рыб при $p \leq 0.05$. Примечание. “—” — не определяли; расшифровка аббревиатур приведена в тексте.

индексы почки и селезенки у возрастных рыб можно объяснить несколькими причинами. Внутренние органы сформированы и с возрастом незначительно увеличиваются в размерах, тогда как наращивание мышечной ткани активно продолжается. Кроме этого, вероятно, постепенно истощается лимфопоэтическая ткань этих органов и снижается уровень лимфо- и миелопоэза. Это связано с тем, что наиболее активно иммунная система функционирует у молодых рыб и в течение нескольких лет после достижения ими половой зрелости. С возрастом активность иммунной системы снижается и, как следствие, увеличивается количество иммунодефицитных особей (Микряков, 1984). Аналогичное снижение с возрастом индексов почки и селезенки отмечено у морского ерша (Эко-токсикологические исследования..., 2016).

Существенных различий между группами рыб по содержанию и фракционному составу ОЛ не обнаружено. Отлов проводили в нагульный период, поэтому в организмах всех исследованных рыб происходили аналогичные процессы. Они были направлены на накопление ресурсов, в том числе запасных липидов, для обеспечения дальнейшего выживания, достижения репродуктивного возраста неполовозрелыми особями и успешного воспроизводства. Обнаруженные различия в содержании ФЛ, НЭЖК, ЭС и УВ у рыб разновозрастных групп, вероятно, были связаны с характером питания и направлением метаболических процессов.

В то же время ткани и органы существенно различались по величине исследуемых показателей, что отражает их структурно-функциональные особенности. Известно, что внутренние ткани и органы рыб различаются по распределению и накоплению липидов и их фракций (Лапин, Шатуновский, 1981; Гершанович и др., 1991; Веланский, Костецкий, 2008). Самым высоким со-

держание ОЛ было в печени клыкача, а самым низким — в крови. Высокое содержание ОЛ в печени обусловлено тем, что этот орган играет огромную роль в обмене липидов. В печени происходят такие процессы, как окисление, синтез и депонирование липидов, которые с помощью крови распределяются по жировым депо, а также другим тканям и органам. Однако содержание ОЛ в крови и печени антарктического клыкача намного превышало данные показатели у ставриды и бычка, обитающих в Чёрном море (Микряков и др., 2011).

В разных тканях при однородном качественном составе липидов количественные показатели отдельных липидных фракций различались. Во всех исследованных тканях и органах самым высоким было процентное содержание ТГ и ФЛ, а самым низким — ЭС и УВ. Процентное содержание разных фракций липидов в тканях *Dissostichus mawsoni* отличалось от такового как у пресноводных, так и у морских рыб, обитающих в эпипелагиальных теплых водах. В зависимости от ткани и органа у пресноводных рыб более высокое содержание ЭС и УВ и низкое — ТГ и ФЛ, а у морских рыб содержание НЭЖК, УВ и ХС выше, а ФЛ — ниже (Шатуновский, 1980; Силкина, 1988; Микряков и др., 2011). Такие различия обусловлены температурой воды и особенностями глубоководного обитания *D. mawsoni*. Высокое содержание ТГ и ФЛ необходимо для обеспечения высоких энергетических затрат организма и устойчивости к низким температурам. Низкий уровень УВ связан с тем, что основная часть углеводов содержится во внутримышечных жировых депо, обеспечивая клыкачу плавучесть (Лапин, Шатуновский, 1981; Гершанович и др., 1991).

Отмечены различия по содержанию конечных продуктов ПОЛ и уровню антиоксидантов в тканях и органах антарктического клыкача. Высокие

уровень МДА и показатель КОС выявлены в почке, а низкие – в крови и селезенке. Вероятно, это связано с соотношением разных форм лейкоцитов в данных тканях и органах. Ранее нами было показано, что содержание гранулоцитов и макрофагов в почках выше, чем в крови и селезенке (Гордеев и др., 2014, 2017). Эти клетки способны нарабатывать АФК и использовать их для выполнения одной из основных своих функций – разрушение чужеродных бактерий (Zapata et al., 1996; van Muiswinkel, Vervoorn-Van Der Wal, 2006). Повышенное содержание АФК может интенсифицировать процессы ПОЛ и снижать количество антиоксидантов. Однако, как и по содержанию основных липидов и их фракций, существенных различий по содержанию конечных продуктов ПОЛ и уровню антиоксидантов между группами рыб не выявлено. Достоверные различия показателей МДА в печени и КОС в крови и печени разновозрастных рыб, вероятно, связаны со снижением уровня АЗ. Небольшие различия в уровне МДА и КОС между группами рыб указывают на оптимальное соотношение разных структур системы ПОЛ ↔ АЗ в исследованных тканях, что препятствует активации окислительных процессов и понижению содержания антиоксидантов, а также способствует реализации компенсаторных реакций в организме (Winston, 1991; Меньшикова и др., 2008).

В результате проведенного исследования существенных различий между самцами и самками *D. mawsoni* не выявлено. В то же время на морском ерше *Scorpaena porcus* L. (Scorpaenidae), обитающем в тёплых водах Чёрного моря, показано, что самцы и самки различались по соматическому индексу печени, уровню продуктов ПОЛ и активности АЗ (Экотоксикологические исследования..., 2016; Залевская и др., 2020). Среди разновозрастных групп антарктического клыкача выявлены достоверные различия по некоторым параметрам, однако большинство исследованных показателей различались незначительно. Сходство показателей у разных возрастных групп антарктического клыкача, скорее всего, связано с тем, что рыбы были отловлены в нагульный период. Известно, что уровень обменных процессов у рыб в разные сезоны года изменяется, а их интенсивность и направление зависят от биотических и абиотических факторов (Шатуновский, 1980; Лапин, Шатуновский, 1981; Силкина, 1988; Гершанович и др., 1991; Lloret et al., 2014; Vinagre et al., 2014; Экотоксикологические исследования..., 2016; Залевская и др., 2020). Полученные результаты указывают на необходимость дальнейших исследований глубоководных видов рыб с целью расширения представлений об их адаптациях к обитанию в водной среде с перманентно низкой температурой.

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 государственного задания (тема № АААА-А18-118012690123-4).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность экипажам судов “Янтарь-31” и “Янтарь-35” (ООО “Орион”, Хабаровск) за помощь в сборе и транспортировке материала. Авторы выражают благодарность ст.н.с. ИБВВ им. И.Д. Папанина Н.И. Силкиной за помощь при обработке проб.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреева Л.И., Кожемякин Н.А., Кишкун А.А. Модификация методов определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. 1988. № 11. С. 41–43.
- Веланский П.В., Костецкий Э.Я. Липиды морских холодноводных рыб // Биол. моря. 2008. Т. 34. № 1. С. 53–57.
- Гершанович А.Д., Лапин В.И., Шатуновский М.И. Особенности обмена липидов у рыб // Успехи соврем. биол. 1991. Т. 3. Вып. 2. С. 207–219.
- Гордеев И.И., Балабанова Л.В., Суворова Т.А. Состав лейкоцитов органов кроветворения антарктического клыкача // Тр. ВНИРО. 2017. Т. 167. С. 6–11.
- Гордеев И.И., Микряков Д.В., Балабанова Л.В., Микряков В.Р. Состав лейкоцитов периферической крови антарктического клыкача *Dissostichus mawsoni* Norman, 1937 (Nototheniidae) // Вопр. ихтиологии. 2014. Т. 54. Вып. 4. С. 479–482.
- Залевская И.Н., Руднева И.И., Селюков А.Г., Щерба А.В. Половые особенности показателей окислительного стресса и содержания антиоксидантов в печени морского ерша *Scorpaena porcus* L. (Scorpaenidae) в прибрежных водах Большого Кавказа // Уч. зап. Крымск. фед. ун-та имени В.И. Вернадского. Биология. Химия. 2020 Т. 6. № 2. С. 64–74.
- Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. М.: Мир. 1975. 300 с.
- Лапин В.И., Шатуновский М.И. Особенности состава, физиологическое и экологическое значение липидов рыб // Успехи соврем. биол. 1981. Т. 92. № 3. С. 380–394.
- Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. и др. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА. 2008. 284 с.
- Микряков В.Р. Закономерности функционирования иммунной системы пресноводных рыб: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М.: ИЭМиЭЖ АН СССР. 1984. 37 с.
- Микряков В.Р., Силкина Н.И., Микряков Д.В. Влияние антропогенного загрязнения на иммунологические и биохимические механизмы поддержания гомеостаза у рыб Черного моря // Биол. моря. 2011. Т. 37. № 2. С. 142–148.

- Морской энциклопедический справочник. В двух томах. Т. 1. Л.: Судостроение. 1986. 512 с.
- Пеккоева С.Н., Мурзина С.А., Нефедова З.А. и др. Роль фосфолипидов в развитии молоди арктическо-бореального вида *Leptoclinus maculatus* (Stichaeidae) // Вопр. ихтиологии. 2017. Т. 57. № 4. С. 467–471.
- Петров А.Ф., Шуст К.В., Пьянова С.В. и др. Методические рекомендации по сбору и обработке промысловых и биологических данных по водным биоресурсам Антарктики для российских научных наблюдателей в зоне действия Конвенции АНТКОМ. М.: ВНИРО. 2014. 106 с.
- Промысловые рыбы России. В двух томах. Т. 2. М.: ВНИРО. 2006. 624 с.
- Семенов В.Л., Ярош А.М. Метод определения антиоксидательной активности биологического материала // Укр. биохим. журн. 1985. Т. 57. № 3. С. 50–52.
- Силкина Н.И. Сезонная динамика липидов сыворотки крови и ее связь с иммунологической реактивностью рыб: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: ИМЭЖ РАН. 1988. 17 с.
- Шатуновский М.И. Экологические закономерности обмена веществ морских рыб. М.: Наука. 1980. 238 с.
- Шуст К.В. Рыбы и рыбные ресурсы Антарктики. М.: ВНИРО. 1998. 163 с.
- Экотоксикологические исследования прибрежной черноморской ихтиофауны в районе Севастополя. М.: ГЕОС. 2016. 360 с.
- Chen L., DeVries A.L., Cheng C.-H.C. Convergent evolution of antifreeze glycoproteins in Antarctic notothenioid fish and Arctic cod // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 94. № 8. P. 3817–3822.
- DeVries A.L. Glycoproteins as biological antifreeze agents in Antarctic fishes // Science. 1971. V. 172. № 3988. P. 1152–1155.
- Folch J., Lees M., Stanley G.N. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. № 3. P. 497–509.
- Giraldo C., Boutoute M., Mayzaud P. et al. Lipid dynamics in early life stages of the icefish *Chionodraco hamatus* in the Dumont d'Urville Sea (East Antarctica) // Polar Biol. 2017. V. 40. P. 313–320.
- Giraldo C., Stasko A., Choy E.S. et al. Trophic variability of Arctic fishes in the Canadian Beaufort Sea: a fatty acids and stable isotopes approach // Polar Biol. 2015. V. 39. P. 1267–1282.
- Hagen W., Kattner G., Friedrich C. The lipid compositions of high-Antarctic notothenioid fish species with different life strategies // Polar Biol. 2002. V. 23. № 11. P. 785–791.
- Lloret J., Shulman G., Love R.M. Condition and health indicators of exploited marine fishes. Wiley-Blackwell. 2014. 247 p.
- Mayzaud P., Chevallier J., Tavernier E. et al. Lipid composition of the Antarctic fish *Pleuragramma antarcticum*. Influence of age class // Polar Sci. 2011. V. 5. P. 264–271.
- Murзина S.A., Pekkoeva S.N., Kondakova E.A. et al. Tiny but fatty: lipids and fatty acids in the daubed shanny (*Leptoclinus maculatus*), a small fish in svalbard waters // Biomolecules. 2020. V. 10. № 3. Art. 368. <https://doi.org/10.3390/biom10030368>
- Nelson J.S. Fishes of the World: Fourth ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons. 2006. 624 p.
- Sargent J.R., Tocher D.R., Bell J.G. The lipids // Fish nutrition: 3rd ed. San Diego, California: Elsevier/Academic Press. 2002. P. 181–257.
- Van Muiswinkel W., Vervoorn-Van Der Wal B. The immune system of fish // Fish diseases and disorders: Protozoan and metazoan infections: 2nd ed. CAB International. 2006. V. 1. P. 678–701. <https://doi.org/10.1079/9780851990156.0678>
- Vinagre C., Madeira D., Mendonca V. et al. Effect of increasing temperature in the differential activity of oxidative stress biomarkers in various tissues of the rock goby, *Gobius paganellus* // Mar. Environ. Res. 2014. V. 97. P. 10–14.
- Winston G.W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals // Comp. Biochem. Physiol. Part. C: Comp. Pharmacol. Toxicol. 1991. V. 100. № 1–2. P. 173–176.
- Zapata A.G., Chiba A., Varas A. Cells and tissues of the immune system of fish // The fish immune system: Organism, pathogen and environment. San Diego: Academic Press. 1996. P. 1–62.

Lipid Composition and Oxidation Processes in the Blood and Internal Organs of the Antarctic Toothfish *Dissostichus mawsoni* Norman, 1937 (Nototheniidae)

D. V. Mikryakov^a, I. I. Gordeev^{b, c}, and V. R. Mikryakov^a

^a*I.D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, Borok 152742, Russia*

^b*Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow 107140, Russia*

^c*Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia*

The content of total lipids and lipid fractions, the intensity of oxidative processes, and the antioxidant defense level in the blood, kidney, spleen, and liver of the Antarctic toothfish *Dissostichus mawsoni* (Actinopterygii: Nototheniidae) that inhabit stably cold Antarctic waters were studied depending on gender and age. This study revealed no significant differences between males and females. Significant variations in some parameters between the age groups of toothfish were found in the blood and liver. However, the differences in most of the studied parameters were insignificant, which is probably due to the capture of fish during their feeding period. The high content of total lipids, the content of stored triacylglycerols, and the antioxidant defense level in the blood and organs of *D. mawsoni* reflect the physiological features that make it possible for the species to live in Antarctic conditions.

Keywords: Antarctic toothfish *Dissostichus mawsoni*, blood, kidney, spleen, liver, lipids and lipid fractions, lipid peroxidation, antioxidant activity

УДК 597.556.331.1(262.5)

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ФОРМЫ ОТОЛИТОВ У СТАВРИДЫ *TRACHURUS MEDITERRANEUS* (STEINDACHNER, 1868) (PERCIFORMES: CARANGIDAE) ИЗ ПРИБРЕЖНЫХ ВОД СЕВАСТОПОЛЯ И БАЛАКЛАВЫ (ЧЁРНОЕ МОРЕ)

© 2021 г. М. В. Чесалин*

Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН,
Севастополь 299011, Россия

*e-mail: chesalin.mikhail@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.03.2020 г.

После доработки 11.08.2020 г.

Принята к публикации 05.10.2020 г.

С использованием двух методических подходов сравнили форму отолитов в девяти выборках черноморской ставриды *Trachurus mediterraneus*, отловленной в бухтах у Севастополя и Балаклавы в 2017–2018 гг. При первом подходе анализировали размеры отолитов (длина, ширина, периметр, площадь), приведенные к средней длине рыбы из всех выборок, и рассчитанные на их основе шесть индексов формы отолитов (отношение длины к ширине, циркулярность, прямоугольность, округлость, фактор формы, эллиптичность). При втором подходе использовали коэффициенты эллиптического анализа Фурье контуров отолитов. Достоверных различий между левым и правым отолитами, а также между отолитами самцов и самок ставриды не обнаружено. Результаты дискриминации отдельных выборок при этих двух подходах различались, однако в целом отолиты черноморской ставриды из всех исследованных бухт достоверно не различались ни по индексам формы, ни по коэффициентам Фурье.

Ключевые слова: *Trachurus mediterraneus*, отолиты, форма, индексы, коэффициенты Фурье, Чёрное море

DOI: 10.31857/S0134347521030049

Черноморская ставрида – это популяция средиземноморской ставриды *Trachurus mediterraneus* (Steindachner, 1868), обитающая в Чёрном море, которая заходит также в Азовское и Мраморное моря. Ранее Ю. Г. Алеев (1956) описал черноморскую ставриду как самостоятельный подвид, который получил название *T. mediterraneus ponticus* Aleev, 1956. Генеральная комиссия по рыболовству в Средиземном море (GFCM) и Научно-технический и экономический комитет по рыболовству (STECF) при Европейской Комиссии считают черноморскую ставриду самостоятельной единицей запаса, поэтому оценка биомассы и управление промыслом этого вида проводятся отдельно от таковых ставриды из Средиземного моря (GFCM, 2012; STECF, 2015). Однако недавние генетические исследования показали, что черноморская ставрида не является ни самостоятельным видом, ни подвидом и ее следует рассматривать как черноморское стадо средиземноморской ставриды (Слынько и др., 2018).

Черноморская ставрида имеет сложную внутривидовую структуру. В Чёрном море Ю. Г. Алеев (1957) выделял четыре локальных стада: юго-западное (босфорское), северное (крымское), восточное (кавказское) и южное (анатолийское).

Кроме этого, известны две формы черноморской ставриды: мелкая и крупная (Алеев, 1957; Georgiev, Kolarov, 1962; Stoyanov et al., 1963), которые различаются размерами, скоростью роста, продолжительностью жизни, миграционной активностью и др. Небольшие различия отмечены и в форме отолитов (Ревина, Сафьянова, 1965). Недавние исследования ряда популяционных, морфологических, морфофизиологических и паразитологических характеристик ставриды, обитающей у побережья Крыма, показали, что в некоторых районах существуют обособленные локальные группировки, которые слабо смешиваются между собой (Юрахно, Кузьминова, 2012; Кузьминова, 2013; Кузьминова и др., 2016, 2018; Мельникова, Кузьминова, 2019). В частности, выделена локальная группировка ставриды в Балаклавской бухте, особи которой отличались от рыб из севастопольских бухт по размерам, упитанности и ряду морфометрических показателей, в том числе по отношению длины отолита к его ширине (Кузьминова и др., 2018).

Анализ формы отолитов (otolith shape analysis) – один из современных методов изучения популяционной структуры рыб и выделения их запасов. Известно, что форма отолитов определяется гене-

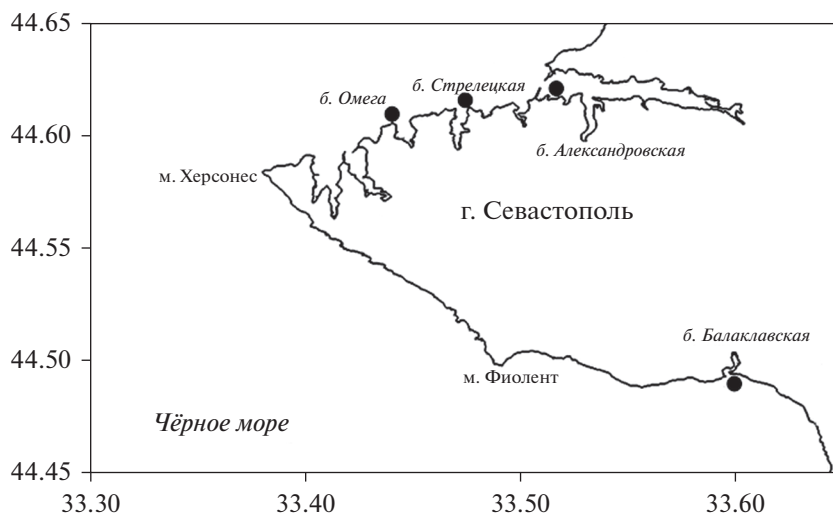


Рис. 1. Карта-схема мест отлова черноморской ставриды *Trachurus mediterraneus*.

тическими факторами, а также факторами среды, условиями питания, роста и физиологическими процессами (Campana, Casselman, 1993; Cardinale et al., 2004; Stransky et al., 2008; Vignon, Morat, 2010). При этом форма отолитов не зависит от краткосрочного изменения состояния рыб, влияющего на форму их тела, например, при голодании (Campana, Casselman, 1993).

Для характеристики формы отолитов применяют несколько методов: анализ морфометрии отолитов (длина, ширина, площадь, периметр) и рассчитанных на их основе безразмерных индексов формы; сравнение расстояний между опорными точками (метками); получение координат опорных точек и их анализ методами геометрической морфометрии; описание контуров с помощью коэффициентов эллиптического анализа Фурье и дискретных вейвлет-коэффициентов. У средиземноморской ставриды анализ формы отолитов методом измерения расстояния между метками использован для дискриминации популяций в Чёрном, Мраморном, Эгейском морях и в северо-восточной части Средиземного моря (Tugan, 2006). Эллиптический анализ Фурье применен для идентификации запасов средиземноморской ставриды в северо-восточной Атлантике и Средиземном море (Abaunza et al., 2008). В отечественных исследованиях анализ формы отолитов для изучения популяционной структуры и дифференциации запасов разных видов рыб стали применять сравнительно недавно (Орлов, Афанасьев, 2013; Павлов, 2016, 2018; Афанасьев и др., 2017; Мазникова и др., 2017; Павлов, Широкова, 2020).

Цель настоящего исследования — провести сравнительный анализ формы отолитов у черноморской ставриды из Балаклавской бухты и сева-стопольских бухт, используя индексы отолитов и метод эллиптического анализа Фурье, чтобы определить возможность дискриминации локальных стад ставриды по этим показателям.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материал отбирали с ноября 2017 г. по май 2018 г. из уловов донных ловушек береговых промысловых бригад в трех сева-стопольских бухтах (Александровская, Омга, Стрелецкая), а также в расположенной в 15 км от г. Севастополя Балаклавской бухте (рис. 1). Для исследования использовали девять выборок черноморской ставриды (табл. 1).

В лаборатории Института биологии южных морей РАН (г. Севастополь) проводили биологический анализ каждой рыбы: определяли общую длину (TL), массу, пол и другие показатели. Отолиты (сагитту) извлекали из головы рыбы, тщательно очищали и использовали для определения возраста, а затем сушили и хранили в микропробирках-эппендорфах с соответствующей нумерацией. Отолиты сеголеток и годовиков ставриды длиной от 8.0 до 11.7 см не анализировали.

Для сравнения формы отбирали только целые левые и правые отолиты. Сухие отолиты по одному выкладывали на темную матовую поверхность ростоуrom влево и акустической бороздкой (*sulcus acusticus*) вниз и фотографировали в отраженном свете под бинокляром МБС-10 (увеличение 8×1) с помощью цифровой камеры DCM500, соединенной с компьютером. Использовали программу анализа изображений ScorePhoto; разрешение изображений 2592×1944 пикселей на дюйм.

Размеры отолитов определяли с помощью программы ImageJ (Abramoff et al., 2004). Изображение каждого отолита калибровали по изображению масштабной линейки. Программа ImageJ позволяет автоматически определять максимальную длину по Ферету (OL , мм), максимальную ширину по Ферету (OW , мм), периметр (P , мм) и площадь отолита (A , мм²). На основе этих измерений, используя формулы, приведенные в ряде работ (Tuset et al., 2003; Ponton, 2006; Zorica et al.,

Таблица 1. Места и даты отлова черноморской ставриды *Trachurus mediterraneus*; размер рыб и количество отолитов, взятых для анализа

Выборка	Место сбора (бухта)	Дата	*Длина рыбы, см	Число отолитов	
				левый	правый
V1	Балаклавская	09.11.2017	<u>13.0–17.6</u> 15.1	23	25
V2	Балаклавская	21.02.2018	<u>13.9–18.1</u> 15.8	77	74
A1	Александровская	13.04.2018	<u>11.7–18.0</u> 14.7	61	62
A2	Александровская	17.04.2018	<u>11.8–18.5</u> 13.7	43	39
O1	Омега	23.03.2018	<u>12.9–16.6</u> 14.6	64	58
O2	Омега	26.03.2018	<u>2.8–16.5</u> 14.8	47	48
S1	Стрелецкая	06.04.2018	<u>13.2–16.8</u> 14.9	34	36
S2	Стрелецкая	22.04.2018	<u>11.3–20.2</u> 13.2	58	58
S3	Стрелецкая	30.05.2018	<u>12.2–21.3</u> 14.6	45	44

*Над чертой – диапазон, под чертой – среднее значение.

2010; Zengin et al., 2015; Павлов, 2016), рассчитывали шесть безразмерных индексов формы отолитов: отношение длины к ширине (*Ar* – aspect ratio), циркулярность (*Cr* – circularity), прямоугольность (*Rc* – rectangularity), округлость (*Rd* – roundness), фактор формы (*Ff* – form factor) и эллиптичность (*El* – ellipticity) (табл. 2).

Контуры отолитов анализировали с помощью пакета SHAPE ver. 1.3 (Iwata, Ukai, 2002). Изображения отолитов из одной выборки в графическом редакторе Photoshop собирали в два файла, соответственно для левых и правых отолитов. Изображения размещали вертикально одно под другим. Для сравнения отолитов в программе SHAPE необходимо, чтобы все отолиты были одинаково ориентированы, поэтому изображения правых отолитов переворачивали в горизонтальной плоскости так, чтобы ростумы левых и правых отолитов были направлены в одну сторону. Изображения преобразовывали в формат BMP (24-bit). Детально принцип работы в пакете SHAPE и возможность его использования при сравнительном анализе формы отолитов рыб описаны ранее (см.: Афанасьев и др., 2017). Эта программа позволяет представить замкнутый контур отолита в виде четырех коэффициентов Фурье для заданного числа гармоник. Чем больше число гармоник, тем точнее описывается контур отолита (Павлов, 2018). Для отолитов черноморской ставриды в программе Chc2Nef выбрали 20 гармоник. С помощью подпрограммы PrinComp были получены

значения главных компонент для каждой рыбы и реконструированные контуры.

Одномерные и многомерные статистические анализы выполняли в программе PAST 4.03 (Hammer et al., 2001). Анализ нормальности распределения отдельных морфометрических параметров отолитов проводили с помощью теста Шапиро–Уилка. Для сравнения абсолютных параметров левого и правого отолитов, а также отолитов самцов и самок использовали парный тест Стьюдента. Для оценки значимости различий между выборками по индексам формы отолитов применяли непараметрический многомерный дисперсионный анализ (one-way PERMANOVA). Классификацию рыб по форме отолитов проводили с помощью линейного дискриминантного анализа (LDA). При этом корректность классификации оценивали по методу складного ножа (джекнаиф – jackknife).

Таблица 2. Формулы расчета индексов формы отолитов

Индекс формы	Формула расчета индекса
Длина к ширине (<i>Ar</i>)	$Ar = OL/OW$
Циркулярность (<i>Cr</i>)	$Cr = P^2/A$
Прямоугольность (<i>Rc</i>)	$Rc = A/(OL \times OW)$
Округлость (<i>Rd</i>)	$Rd = 4A/\pi OL^2$
Фактор формы (<i>Ff</i>)	$Ff = 4\pi A/P^2$
Эллиптичность (<i>El</i>)	$El = (OL - OW)/(OL + OW)$

Примечание. Параметры отолита: *OL* – длина, *OW* – ширина, *P* – периметр, *A* – площадь.

Таблица 3. Сравнение морфометрических параметров левого и правого отоликов, а также отоликов самцов и самок у черноморской ставриды *Trachurus mediterraneus*

Параметр	Левый	Правый	<i>t</i>	<i>p</i>	Самцы	Самки	<i>t</i>	<i>p</i>
	\bar{X}	\bar{X}			\bar{X}	\bar{X}		
<i>OL</i> , мм	5.19	5.19	0.06	0.95	5.23	5.18	1.03	0.31
<i>OW</i> , мм	2.82	2.83	0.69	0.48	2.83	2.81	0.82	0.42
<i>P</i> , мм	13.61	13.63	0.26	0.79	13.73	13.52	1.65	0.10
<i>A</i> , мм	9.99	9.99	0.01	0.99	10.12	9.94	1.09	0.28

Примечание. \bar{X} – среднее значение; *t* – значение теста Стьюдента; *p* – уровень значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Распределения по частоте морфометрических параметров (длина, ширина, периметр, площадь) для правого и левого отоликов черноморской ставриды из всех бухт не отличались от нормального согласно критерию Шапиро–Уилка ($p < 0.05$). Размеры правого и левого отоликов значимо не различались, и значения *p* в критерии Стьюдента во всех случаях были больше 0.05 (табл. 3). Не найдено также значимых различий между абсолютными параметрами отоликов самцов и самок. Поэтому в дальнейших анализах данные по отоликам самцов и самок были объединены, а для сравнения использовали только левые отолики рыб. Считается, что данные по двум парным отоликам избыточны, так как это ведет к искусственному увеличению степени дискриминации между группировками (Павлов, 2018).

Сравнение индексов формы отоликов в девяти выборках показало значимые различия между выборками из Балаклавской (B1, B2) и Стрелецкой (S1, S2, S3) бухт по всем шести индексам, за исключением выборки B1 по индексу округлости (*Rd*). Так, средняя величина индекса *Ar* у ставриды из Балаклавской бухты составляла 1.86–1.88, из Стрелецкой бухты – 1.80–1.82; *Cr* – 18.85–18.91 против 18.27–18.50; *Rc* – 0.69–0.71 и 0.67–0.68; *Ff* – 0.67 и 0.68–0.69; *El* – 0.30–0.31 и 0.28–0.29. У ставриды из бухт Александровская и Омега эти индексы имели промежуточные значения.

Однако данные различия могли быть связаны не с особенностями формы отоликов ставриды в том или ином районе, а с разным размером рыб в исследованных выборках. Чтобы определить связь индексов отоликов с длиной рыбы, были построены линии регрессии и рассчитаны параметры соответствующих уравнений (рис. 2). В одних случаях (*Ar*, *Cr*, *El*) наблюдалось положительное аллометрическое увеличение индексов по мере увеличения длины рыбы, в других случаях (*Re*, *Rd*, *Ff*) отмечена отрицательная аллометрия. Значимая регрессия между величинами индексов отоликов и длиной рыбы ($p < 0.001$, $R^2 > 0.09$) наблюдалась в пяти случаях (*Ar*, *Cr*, *Rd*, *Ff*, *El*), и только между индексом прямоугольности (*Rc*) и *TL* эта регрессия не была значимой ($R^2 = 0.0002$). Поэтому для корректного сравнительного анализа индексов отоликов в разных выборках необхо-

димо было удалить их зависимость от длины тела и пересчитать данные по индексам на длину условной среднеразмерной рыбы из всех выборок. Для этого к размерам отоликов (*OL*, *OW*, *P*, *A*) в программе PAST применили команды Transform → → Remove size from distances → Allometric vs. standard. Таким образом в соответствии с уравнением Эллиотта с соавторами (Elliott et al., 1995) все данные были приведены к единой длине рыбы 14.67 см. Затем все индексы формы отоликов пересчитали и построили графики их средних величин с доверительными интервалами для разных выборок (рис. 2). В результате различия между выборками оказались менее выраженными, чем по нетрансформированным данным, но наибольшее различие по-прежнему наблюдалось между индексами формы отоликов ставриды из Балаклавской бухты и б. Стрелецкая (табл. 4).

Многомерный дисперсионный анализ (PERMANOVA), использованный для оценки различий между выборками по индексам формы отоликов, показал, что значимо от всех других выборок отличались только выборки S1 и S3 из б. Стрелецкая (рис. 3). Выборки из Балаклавской бухты по шести индексам формы отоликов в целом не отличались от выборок из бухт Александровская и Омега, хотя на рис. 3 хорошо заметны отличия выборки B1 по индексам *Rc* и *Rd*. Анализ объединенных выборок рыб из Балаклавской бухты (B1 и B2) и всех севастопольских бухт (A1, A2, O1, O2, S1, S2, S3) не выявил значимых различий ($p = 0.57$) по индексам отоликов.

Согласно анализу контуров отоликов в программе SHAPE, получены величины главных компонент, для визуализации которых построен график распределения особей и центроидов выборок в пространстве первых двух главных компонент (рис. 4). Центроиды восьми выборок распределены очень близко друг к другу, выделяется только выборка B1 из Балаклавской бухты. Эллипсы 95% интервалов центроидов девяти выборок на рисунке не показаны, так как они сильно перекрываются.

Контурные отолики ставриды реконструированы по результатам анализа коэффициентов Фурье (рис. 5). Первая компонента (PC1) характеризовала вытянутость формы отолика, а вторая (PC2) и третья (PC3) компоненты характеризовали выраженность роостра и углубления между

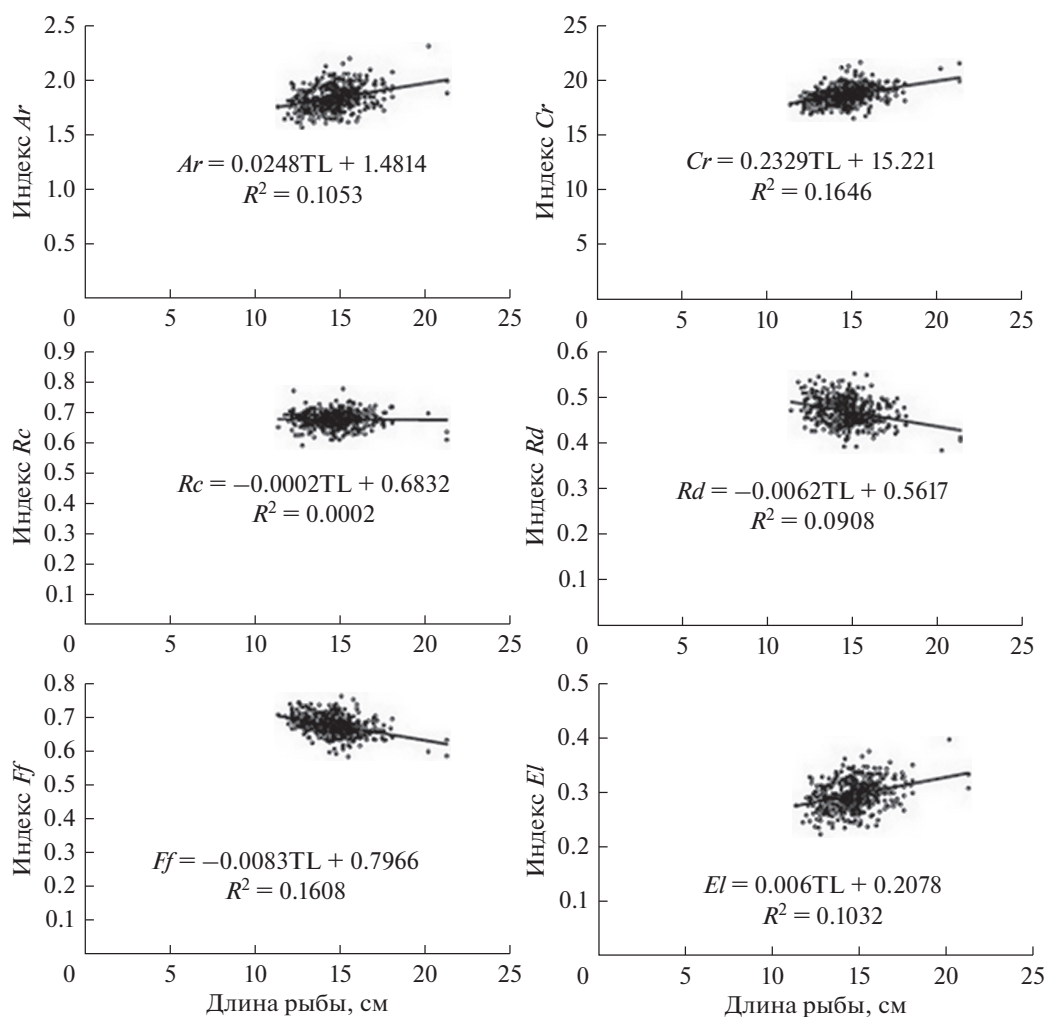


Рис. 2. Соотношение между индексами формы отолитов и длиной тела у черноморской ставриды *Trachurus mediterraneus* (обозначения индексов см. в табл. 2).

рострумом и антирострумом. Заметных различий в усредненных контурах отолитов у рыб из Балаклавской бухты и трёх севастопольских бухт не отмечено. Различия в форме контуров при откло-

нении от средней, особенно по первой компоненте, вероятно, связаны с высокой вариабельностью формы отолитов у ставриды, а также с разным количеством проанализированного материала.

Таблица 4. Значимость различий между индексами формы отолитов у черноморской ставриды *Trachurus mediterraneus* из разных выборок по критерию p в многомерном дисперсионном анализе

Выборка	B1	B2	A1	A2	O1	O2	S1	S2	S3
B1		0.66	0.86	0.89	0.60	0.67	0.13	0.56	0.04
B2	0.66		0.47	0.47	0.20	0.95	0.12	0.91	0.02
A1	0.86	0.47		0.94	0.51	0.49	0.02	0.36	0.002
A2	0.89	0.47	0.94		0.62	0.47	0.02	0.34	0.004
O1	0.60	0.20	0.51	0.62		0.19	0.01	0.12	0.000
O2	0.67	0.95	0.49	0.47	0.19		0.09	0.88	0.013
S1	0.13	0.12	0.02	0.02	0.01	0.09		0.11	0.47
S2	0.56	0.91	0.36	0.34	0.12	0.88	0.11		0.02
S3	0.04	0.02	0.002	0.004	0.0004	0.01	0.47	0.02	

Примечание. Жирным шрифтом выделены значимые различия между выборками ($p < 0.05$). Обозначения выборок, как в табл. 1.

Таблица 5. Классификационная матрица дискриминантного анализа выборок черноморской ставриды *Trachurus mediterraneus* по коэффициентам Фурье контуров отолитов

Выборка	B1	B2	A1	O1	O2	A2	S1	S2	S3	Всего
B1	15	0	1	2	0	1	0	4	0	23
B2	10	21	5	10	9	5	5	7	5	77
A1	11	8	11	3	11	7	3	7	0	61
O1	8	6	3	10	7	2	0	7	0	43
O2	10	13	6	12	15	3	0	5	0	64
A2	7	10	3	6	5	5	5	5	1	47
S1	7	6	3	8	3	1	1	4	1	34
S2	9	7	5	5	3	4	4	16	5	58
S3	13	5	4	7	4	3	1	7	1	45
Всего	90	76	41	63	57	31	19	62	13	452

Примечание. Обозначения выборок, как в табл. 1.

Коэффициенты Фурье отолитов каждой рыбы далее использовали для дисперсионного (PERMANOVA) и линейного дискриминантного

(LDA) анализов. При дисперсионном анализе выделилась выборка B1 из Балаклавской бухты; эта выборка достоверно отличалась от всех других

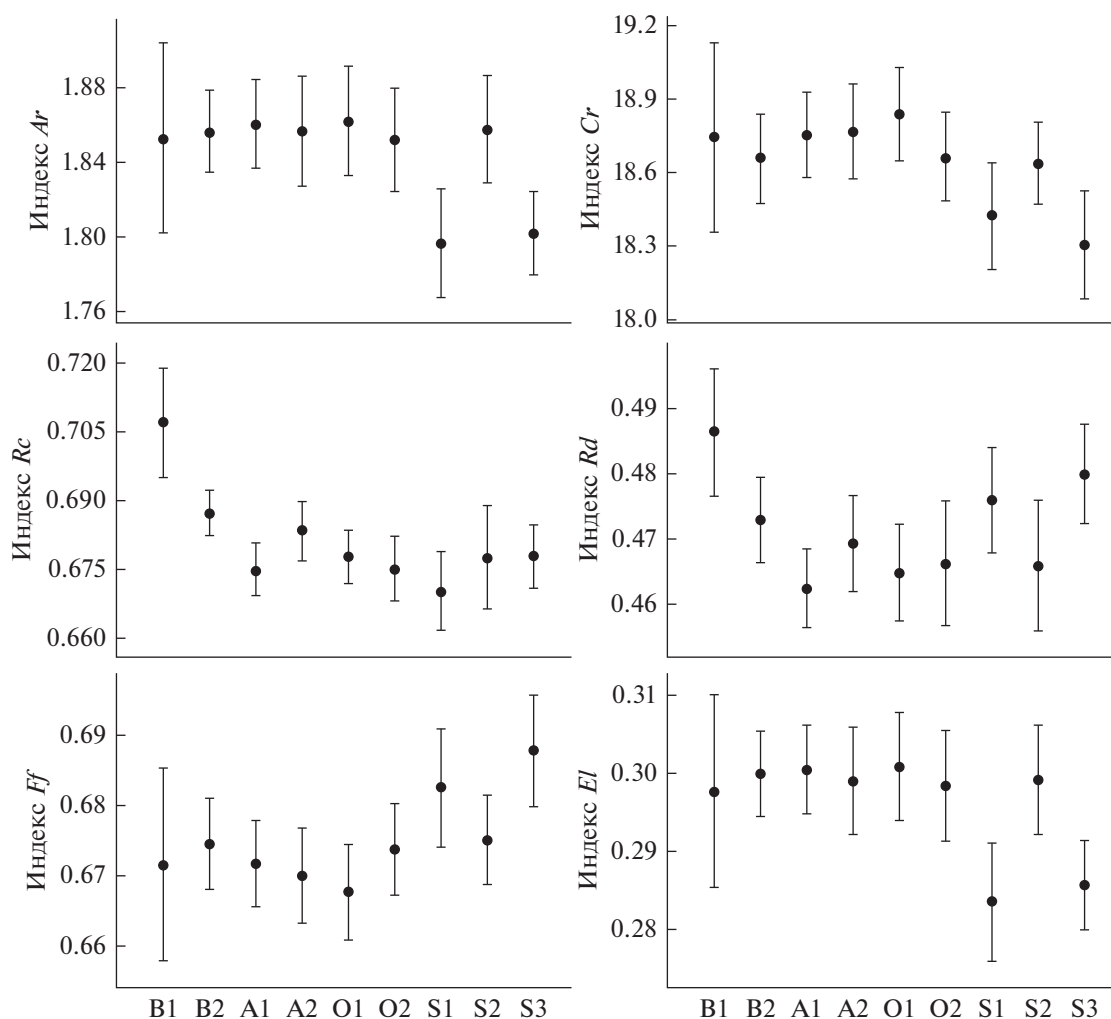


Рис. 3. Индексы формы левого отолита черноморской ставриды *Trachurus mediterraneus* из разных выборок (обозначения выборок см. в табл. 1, индексов формы отолитов – в табл. 2). На рисунке показаны средние значения индексов и их 95% доверительные интервалы.

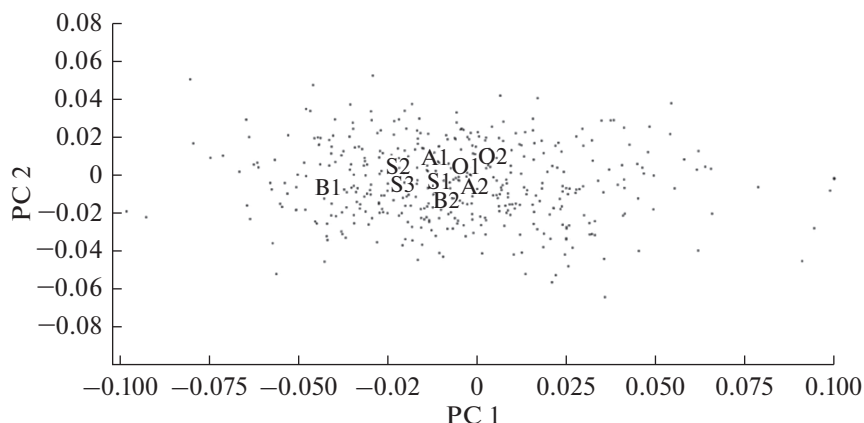


Рис. 4. Распределение особей (точки) и центроидов выборок по контурам отолитов черноморской ставриды *Trachurus mediterraneus* в пространстве первых двух главных компонент (PC 1 и PC 2) (обозначения выборок см. в табл. 1).

выборок ($p < 0.001$). Достоверные различия обнаружены также между выборкой S3 из б. Стрелецкая с выборками A2, B2 и O2, тогда как все остальные выборки не различались между собой.

Пространственное распределение центроидов выборок, построенных методом дискриминантного анализа, незначительно отличалось от такового при использовании метода главных компонент. Корректность классификации выборок оказалась наиболее высокой для выборки B1 (65.2%) и составляла не более 29% для других восьми выборок (табл. 5). В целом корректность

классификации девяти выборок методом джек-найф не превышала 12.0%.

При объединении всех выборок из севастопольских бухт (A1, A2, O1, O2, S1, S2, S3) и при сравнении их с объединенной выборкой из Балаклавской бухты (B1, B2) дискриминантный анализ не показал различий между данными выборками, а гистограммы их частотного распределения были приблизительно одинаковыми (рис. 6). Корректность классификации “севастопольских” и “балаклавских” выборок методом джекнайф составила 55.9%.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования показали, что средние размеры черноморской ставриды в Балаклавской бухте немного больше, чем в севастопольских бухтах, что согласуется с данными, полученными

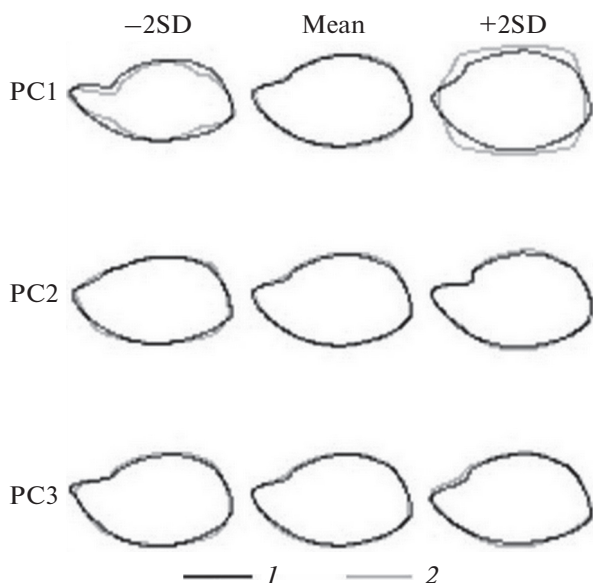


Рис. 5. Реконструированные контуры отолитов черноморской ставриды *Trachurus mediterraneus*, соответствующие первым трем главным компонентам (PC 1–3). Mean – усредненный контур, $\pm 2SD$ – два стандартных отклонения. 1 – Балаклавская бухта; 2 – севастопольские бухты.

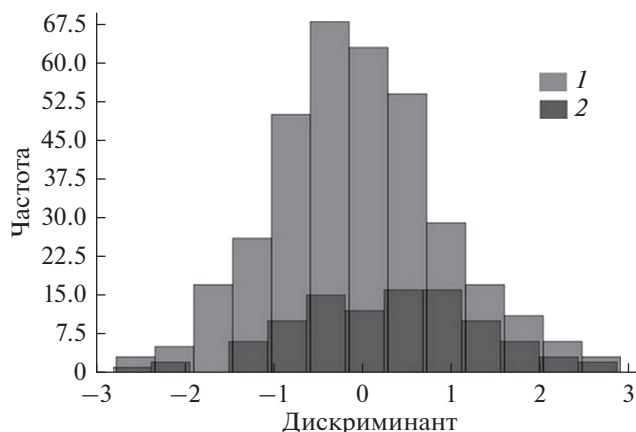


Рис. 6. Гистограммы частот распределения формы контуров отолитов черноморской ставриды *Trachurus mediterraneus* при дискриминантном анализе. 1 – севастопольские бухты; 2 – Балаклавская бухта.

для этих акваторий в 2014–2017 гг. (Кузьминова и др., 2018), когда авторы, указывая на различия средних величин отношения длины отолита к его ширине, не учитывали её зависимость от длины тела рыбы.

Два методических подхода — использование индексов формы отолитов и анализ контуров отолитов по коэффициентам Фурье — показали несколько разные результаты дифференциации отдельных выборок. Так, по результатам дисперсионного анализа при использовании шести индексов формы отолитов от всех других выборок достоверно отличались только две выборки (S1, S3) из б. Стрелецкая. При сравнении же формы контуров отолитов в девяти выборках с помощью методов главных компонент, дисперсионного и дискриминантного анализа достоверно от всех других выборок выделялась лишь выборка В1 из Балаклавской бухты.

В целом оба подхода не выявили значимых различий между двумя объединенными выборками из севастопольских бухт и Балаклавской бухты. Таким образом, исследование формы отолитов свидетельствует об относительной однородности стад ставриды в севастопольских бухтах и Балаклавской бухте. Возможно, в этих районах существуют локальные группировки ставриды, которые различаются по размерно-возрастному и половому составу, ряду морфологических и других характеристик, однако степень их изоляции и устойчивости недостаточна, чтобы выделять данные группировки в отдельные популяции и единицы запаса.

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 по теме “Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты гидробионтов и их популяций в биотопах с различными физико-химическими режимами”, регистрационный номер НИОКТР: АААА-А18-118021490093-4, а также при поддержке проекта РФФИ “Отклик черноморской пелагической экосистемы на изменение климата в регионе (на примере медуз, гребневиков и мелких пелагических рыб)”, № 18-44-920022p_a.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность сотруднику ИнБЮМ Н.С. Кузьминовой за помощь в сборе отолитов и за данные по биоанализам черноморской ставриды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алеев Ю.Г. О систематическом положении ставриды Черного моря // *Вопр. ихтиологии*. 1956. Вып. 7. С. 174–184.
- Алеев Ю.Г. Ставриды (*Trachurus*) морей СССР // *Тр. Севастоп. биол. ст.* 1957. Т. 9. С. 167–242.
- Афанасьев П.К., Орлов А.М., Рольский А.Ю. Сравнительный анализ формы отолитов как инструмент видовой идентификации и изучения популяционной организации различных видов рыб // *Зоол. журн.* 2017. Т. 96. № 2. С. 192–200.
- Кузьминова Н.С. Популяционные параметры ставриды в различных акваториях Черного моря в современный период // *Рыб. хоз-во Украины*. 2013. № 3. С. 35–45.
- Кузьминова Н.С., Овен Л.С., Салехова Л.П. и др. Долговременные изменения популяционных и морфофизиологических параметров некоторых видов черноморских рыб из прибрежной зоны Севастополя и Крыма // *Экотоксикологические исследования прибрежной черноморской ихтиофауны в районе Севастополя*. М.: ГЕОС. 2016. С. 31–46.
- Кузьминова Н.С., Мурзин Ю.Л., Самотой Ю.В. Популяционные, морфофизиологические и морфометрические отличия черноморской ставриды из прибрежной зоны Севастополя и Балаклавы // *Уч. зап. Крымск. фед. ун-та им. В.И. Вернадского. Биология. Химия*. 2018. Т. 4(70). № 4. С. 97–107.
- Мазникова О.А., Афанасьев П.К., Орлов А.М. и др. Сравнительный анализ формы отолитов, пространственное распределение и размерный состав черного палтуса *Reinhardtius hippoglossoides matsuurae* в западной части Берингова моря // *Изв. ТИНРО*. 2017. Т. 191. С. 97–113.
- Мельникова Е.Б., Кузьминова Н.С. Индивидуальный рост и продукционные характеристики стад ставриды *Trachurus mediterraneus*, обитающих на юго-западном шельфе Крыма // *Уч. зап. Крымск. фед. ун-та им. В.И. Вернадского. Биология. Химия*. 2019. Т. 5(71). № 3. С. 33–48.
- Орлов А.М., Афанасьев П.К. Отолитометрия как инструмент анализа популяционной структуры тихоокеанской трески *Gadus macrocephalus* (Gadidae, Gadosteii) // *Амур. зоол. журн.* 2013. № 3. С. 327–331.
- Павлов Д.А. Дифференциация трех видов рода *Upeneus* (Mullidae) по форме отолитов // *Вопр. ихтиологии*. 2016. Т. 56. № 1. С. 41–55.
- Павлов Д.А. Дифференциация чернополосой козобородки *Upeneus tragula* Richardson, 1846 (Perciformes: Mullidae) в прибрежной зоне Вьетнама на основе анализа формы отолитов // *Биол. моря*. 2018. Т. 44. № 5. С. 347–356.
- Павлов Д.А., Широкова Е.А. Изменчивость структуры отолитов в популяциях ротана *Percottus glenii* (Odontobutidae) Центральной России // *Вопр. ихтиологии*. 2020. Т. 60. № 1. С. 52–62.
- Ревина Н.И., Сафьянова Т.Е. К вопросу разделения “мелкой” и “крупной” ставриды по отолитам // *Рыб. хоз-во*. 1965. № 6. С. 11–13.
- Слынько Ю.В., Болтачев А.Р., Карпова Е.П., Слынько Е.Е. Таксономический статус и внутривидовая дифференциация черноморской ставриды *Trachurus mediterraneus ponticus* (Aleev, 1956) (Carangidae) // *Биол. моря*. 2018. Т. 44. № 2. С. 106–114.
- Юрахно В.М., Кузьминова Н.С. О существовании возможных локальных группировок черноморской ставриды в прибрежье Севастополя // *Современ-*

- ные рыбохозяйственные и экологические проблемы Азово-Черноморского региона: Материалы VII Международ. конф. Керчь 20–23 июня 2012 г. Керчь. 2012. Т. 1. С. 100–103.
- Abaunza P., Murta A.G., Campbell N. et al.* Stock identity of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in the Northeast Atlantic and Mediterranean Sea: Integrating the results from different stock identification approaches // *Fish. Research*. 2008. V. 89. P. 196–209.
- Abramoff M.D., Magalhaes P.J., Ram S.J.* Image Processing with ImageJ // *Biophotonics Int*. 2004. V. 11. № 7. P. 36–42.
- Campana S.E., Casselman J.M.* Stock discrimination using otolith shape analysis // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1993. V. 50. P. 1062–1083.
- Cardinale M., Doering-Arjes P., Kastowsky M., Mosegaard H.* Effects of sex, stock, and environment on the shape of known-age Atlantic cod (*Gadus morhua*) otoliths // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 2004. V. 61. P. 158–167.
- Elliott N.G., Haskard K., Koslow J.A.* Morphometric analysis of orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*) off the continental slope of southern Australia // *J. Fish Biol.* 1995. V. 46. № 2. P. 202–220.
- Georgiev Z., Kolarov P.* On the migration and distribution of horse mackerel (*Trachurus ponticus*, Aleev) in the western part of Black Sea // *Arbeiten des Zentralen Forschungsinstitutes für Fischzucht und Fischerei*. Varna. 1962. V. 2. P. 148–172 p.
- GFCM (General Fisheries Commission for the Mediterranean), SAC, Report of the working group on stock assessment of small pelagic species, Split, Croatia, 5–9 November 2012. P. 1–258.
- Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D.* PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis // *Paleontol. Electron*. 2001. V. 4. № 1. P. 1–9.
- Iwata H., Ukai Y.* SHAPE: a computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors // *J. Heredity*. 2002. V. 93. № 5. P. 384–385.
- Ponton D.* Is geometric morphometrics efficient for comparing otolith shape of different fish species? // *J. Morphol.* 2006. V. 267. № 6. P. 750–757. <https://doi.org/10.1002/jmor.10439>
- STECF (Scientific, Technical and Economic Committee for Fisheries). Black Sea assessments (STECF-15-16). 2015. Publications Office of the European Union. Luxembourg. EUR 27517 EN. JRC 98095.
- Stoyanov S., Georgiev Z., Ivanov L. et al.* Fishes in Black Sea. Varna: State Publishing House. 1963. 101 p.
- Stransky C., Murta A.G., Schlickeisen J., Zimmermann C.* Otolith shape analysis as a tool for stock separation of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in the Northeast Atlantic and Mediterranean // *Fish. Res.* 2008. V. 89. P. 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2007.09.017>
- Turan C.* The use of otolith shape and chemistry to determine stock structure of Mediterranean horse mackerel *Trachurus mediterraneus* (Steindachner) // *J. Fish Biol.* 2006. V. 69. P. 165–180.
- Tuset V.M., Lozano I.J., González J.A. et al.* Shape indices to identify regional differences in otolith morphology of comber, *Serranus cabrilla* (L., 1758) // *J. Appl. Ichthyol.* 2003. V. 19. P. 88–93. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0426.2003.00344.x>
- Vignon M., Morat F.* Environmental and genetic determinant of otolith shape revealed by a non-indigenous tropical fish // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2010. 411. P. 231–241. <https://doi.org/10.3354/meps08651>
- Zengin M., Saygın S., Polat N.* Otolith shape analyses and dimensions of the anchovy *Engraulis encrasicolus* L. in the Black and Marmara Seas // *Sains Malays.* 2015. V. 44. № 5. P. 657–662. <https://doi.org/10.17576/jsm-2015-4405-03>
- Zorica B., Sinovčić G., Čikeš Keč V.* Preliminary data on the study of otolith morphology of five pelagic fish species from the Adriatic Sea (Croatia) // *Acta Adriat.* 2010. V. 51. № 1. P. 89–96.

Otolith Shape Analysis of the Mediterranean Horse Mackerel, *Trachurus mediterraneus* (Steindachner, 1868) (Perciformes: Carangidae) from the Coastal Waters of Sevastopol and Balaklava (the Black Sea)

M. V. Chesalin

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol 299011, Russia

Otolith shape analysis was conducted with the use of two methods in nine samples of the Mediterranean horse mackerel *Trachurus mediterraneus* (Steindachner, 1868) caught in Sevastopol and Balaklava bays in 2017–2018. The first method was based on the otolith morphometric measurements: length, width, perimeter, and area which were adjusted to the average fish length from all studied samples and the six otolith shape indices were obtained for the analysis: aspect ratio, circularity, rectangularity, roundness, form factor, and ellipticity. The second approach used coefficients of the elliptical Fourier analysis of otolith contours. No significant differences were found between left and right otoliths as well as between otoliths of males and females. The results of discrimination between the samples were different for these two methods, but in general, otoliths of the horse mackerel from all studied bays did not differ significantly in both shape indices and Fourier coefficients.

Keywords: *Trachurus mediterraneus*, otolith, shape, indices, Fourier analysis, Black Sea

УДК 574.2

ИНТЕГРИРОВАННЫЙ ОТВЕТ БИОМАРКЕРОВ ПРИ ОЦЕНКЕ КАЧЕСТВА МОРСКОЙ СРЕДЫ НА ПРИМЕРЕ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *MYTILUS TROSSULUS* (GOULD, 1850)

© 2021 г. А. А. Истомина¹, А. А. Мазур^{1, *}, В. П. Челомин¹, С. П. Кукла¹, В. В. Слободскова¹, А. Ю. Звягинцев², Ю. В. Федоренц¹, О. А. Еловская¹, Л. Ф. Колосова¹

¹Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН, Владивосток 690041, Россия

²Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток 690041, Россия

*e-mail: mazur.aa@poi.dvo.ru

Поступила в редакцию 16.03.2020 г.

После доработки 03.08.2020 г.

Принята к публикации 24.09.2020 г.

Рассмотрена возможность использования для оценки загрязнения морской среды таких биомаркеров, как стабильность мембран лизосом, индекс генетического повреждения, активность каталазы и глутатион-S-трансферазы, содержание малонового диальдегида и индекс кондиции. На основе данных показателей рассчитан индекс, отражающий интегрированный ответ биомаркеров. Полученный индекс подтвердил известную степень загрязнения выбранных акваторий, которая возрастает в ряду: зал. Восток < б. Козьмина < б. Золотой Рог.

Ключевые слова: *Mytilus trossulus*, стабильность мембран лизосом, индекс генетического повреждения, каталаза, глутатион-S-трансфераза, индекс кондиции, интегрированный ответ биомаркеров

DOI: 10.31857/S0134347521030062

Стремительное увеличение антропогенного пресса на прибрежные акватории определяет необходимость активного внедрения в экологическую практику оперативных методов и подходов оценки качества их состояния. Важной задачей остается оценка биологических откликов (эффектов) морских организмов на действие загрязнения. Ученые всего мира активно изучают возможность интеграции индивидуальных реакций биомаркеров в ответ на загрязнение для определения степени нарушения биологических систем и их количественной оценки (Dagnino et al., 2007; Sanchez et al., 2013; Vieira et al., 2014; Benali et al., 2015; González-Fernández et al., 2016; Lompré et al., 2020). На основе математических и статистических преобразований данных рассчитываются индексы, объединяющие реакции биомаркеров на всех уровнях биологической организации. Таким образом, полученные индексы интегрируют синергичные и кумулятивные эффекты разных стрессоров, присутствующих в среде обитания, что позволяет судить о состоянии здоровья исследуемых организмов.

В качестве эффективного неспецифического биомаркера прямого или косвенного воздействия загрязняющих веществ широко применяется ана-

лиз уровня повреждения ДНК (ИГП – индекс генетического повреждения) (Mitchelmore, Chipman, 1998; Frenzilli et al., 2001; Regoli et al., 2004; Al-Fanharawi et al., 2018).

В лабораторных исследованиях и программах биомониторинга часто используют антиоксидантные ферменты каталазу (КАТ) и глутатион-S-трансферазу (GST) как биомаркеры окислительного стресса (Damien et al., 2007; Maria, Bebianno, 2011; Benali et al., 2015). Функция КАТ состоит в разрушении образующегося в организме при окислительных процессах токсичного пероксида водорода (Halliwell, Gutteridge, 2007), который является основным клеточным предшественником высокореактивного гидроксильного радикала ($\text{HO}^{\cdot-}$). Удаление H_2O_2 ферментом КАТ – это важный механизм защиты морских организмов от окислительного стресса (Storey, 1996). Глутатион-S-трансфераза принимает участие в детоксикации полихлорированных бифенилов, полициклических ароматических углеводородов, хлорорганических и фосфорорганических пестицидов в результате их конъюгации с глутатионом (Hayes et al., 2005; Blanchette et al., 2007), а также связывает тяжелые металлы, снижая их токсичность для организмов (She et al., 2003; Yoshinaga et al., 2007).

Накопление продуктов перекисного окисления липидов (малонового диальдегида – МДА) служит биомаркером окислительного стресса у водных организмов, для которых характерно высокое содержание в липидах полиненасыщенных жирных кислот (Chelomin, Belcheva, 1991; Lushchak, 2011).

Использование показателя стабильности мембран лизосом (СМЛ) в качестве биомаркера общего стресса рекомендовано в рамках европейских региональных программ биомониторинга загрязнения (Vethaak et al., 2017). Это один из ключевых биомаркеров комплексной оценки воздействия загрязняющих веществ, предлагаемой для стран Евросоюза (Martinez-Gomez et al., 2015).

На уровне организма/популяции общую токсичность среды обитания оценивают с помощью индекса кондиции (ИК) (Benali et al., 2015), позволяющего получить информацию о физиологическом состоянии организма и об условиях роста. Данный показатель совместно с биомаркерами на молекулярно-клеточном уровне обеспечивает целостный и интегративный подход к изучению биологических эффектов.

Двустворчатый моллюск *Mytilus trossulus* (Gould, 1850), ведущий прикрепленный образ жизни, активно фильтрует воду и аккумулирует различные загрязняющие вещества, поэтому его часто используют в качестве тест-объекта для биомониторинга загрязнения морской среды (Bendell-Young et al., 2004; Pempkowiak et al., 2006; Lehtonen et al., 2016). В зал. Петра Великого *M. trossulus* доминирует в сообществах обрастания большинства гидротехнических сооружений (Звягинцев, 2005).

Цель настоящей работы – оценить соответствие реакции выбранного набора биомаркеров степени загрязнения окружающей среды и рассчитать интегрированный ответ биомаркеров, отражающий как состояние здоровья мидий, так и качество морской среды, в которой они обитают. Для этого на примере мидии *M. trossulus* на клеточном уровне организации исследованы СМЛ, уровень повреждения ДНК (ИГП), активность КАТ и GST, содержание малонового диальдегида (МДА), а на уровне организма – индекс кондиции (ИК).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Характеристика мест сбора материала

Особей *Mytilus trossulus* примерно одинакового размера собирали в посленерестовый период в ноябре 2018 г. в относительно чистой акватории зал. Восток (42°53'32" N; 132°44'6" E) и в загрязненных бухтах Козьмина (42°42'95" N; 133°00'71" E) и Золотой Рог (43°7'16" N; 131°54'46" E) Японско-

го моря. Зал. Восток обычно рассматривают как подверженную минимальному антропогенному воздействию фоновую акваторию в пределах зал. Петра Великого (Чернова, 2010; Сокольников и др., 2015). Здесь располагается Государственный природный комплексный морской заказник “Залив Восток”. Однако в последнее время органическое загрязнение залива увеличивается, что связано с рекреационной нагрузкой (Бойченко, 2009; Барышева и др., 2019). В б. Козьмина расположен крупный российский нефтепорт, через который осуществляется экспорт топливно-энергетических ресурсов в страны Азиатско-Тихоокеанского региона; здесь находится пункт разбора морских судов на металлолом, кроме этого прибрежная акватория б. Козьмина испытывает антропогенное воздействие (пос. Козьмино). Бухта Золотой Рог – самая грязная в зал. Петра Великого (Качество морских вод..., 2018), в нее поступают сточные воды г. Владивостока, негативное воздействие оказывают городские порты и судоремонтные заводы, маломерный и крупнотоннажный флот. На дне бухты образовался осадочный “нефтебитумный” слой, толщина которого местами достигает 0.7–1.5 м (Качество морских вод..., 2018). Воды б. Золотой Рог относят к V классу качества (грязные), в то время как воды б. Козьмина – к III классу (умеренно загрязненные) (Качество морских вод..., 2017, 2018, 2019).

Предварительная подготовка материала

Собранных мидий в течение двух дней акклимировали к лабораторным условиям (аэрируемая фильтрованная морская вода, 16°C), чтобы снять стресс от транспортировки. Объектом исследования служила пищеварительная железа, которая является центром регуляции метаболизма, а также участвует в механизмах иммунной защиты и поддержания гомеостаза внутренней среды, в процессах детоксикации, аккумуляции и элиминации ксенобиотиков (Vasanthi et al., 2017). Для определения СМЛ использовали по 10 мидий из каждой акватории; для определения активности GST и КАТ, ИК, а также содержания МДА – по 25 особей и для определения ИГП – по 5 особей. Для биохимического анализа реакции GST, КАТ и МДА пищеварительную железу от пяти мидий объединяли в одну пробу (всего 5 проб для каждой выборки) и быстро замораживали при температуре –80°C.

Стабильность мембран лизосом

Для оценки СМЛ применяли цитохимический метод, основанный на захвате лизосомами красителя нейтрального красного, время удерживания которого отражает степень повреждения мембран (Martinez-Gómez et al., 2015). Гемолимфу (0.1 мл)

получали из переднего мускула-аддуктора каждой мидии с помощью шприца для подкожных инъекций объемом 1 мл (соотношение гемолимфы и фильтрованной морской воды в шприце составляло 1 : 1). После 15 мин инкубации клеток с красителем при температуре 15°C препарат просматривали под микроскопом Axiostar plus (увеличение $\times 400$) сначала с интервалом 15 мин, а затем с интервалом 30 мин (до 180 мин для здоровых клеток). Время нахождения препарата под объективом микроскопа в каждом случае не превышало 1 мин. Полученные результаты выражали как последнее время удерживания красителя у 50% клеток препарата.

Индекс кондиции

ИК рассчитывали как отношение сырой массы мягких тканей мидии (г) к общей массе тела (раковина + мягкие ткани + мантийная жидкость, г), умноженное на 100 (Benali et al., 2015).

Индекс генетического повреждения

Для оценки уровня повреждения молекулы ДНК использовали щелочной вариант метода ДНК-комет, описанный ранее (Слободскова и др., 2015). Цифровые изображения обрабатывали в компьютерной программе CaspLab (v. 1.2.2). Для каждой кометы определяли долю ДНК в хвосте и на ее основе рассчитывали ИГП. При этом выборку ДНК-комет, полученных из одного геле-слайда (1 слайд = 1 особь; $n = 5$), разделили на пять классов в зависимости от степени фрагментации клеточной ДНК: класс C0 – < 5% фрагментированной ДНК (повреждение отсутствует или минимально); C1 – 5–20% (слабое повреждение); C2 – 20–40% (среднее); C3 – 40–75% (высокое) и C4 – > 75% (экстремальное повреждение) (Mitchellmore, Chirman, 1998). ИГП рассчитывали по формуле $(C1 + 2 \times C2 + 3 \times C3 + 4 \times C4) / (C0 + C1 + C2 + C3 + C4)$. В исследованных группах мидий анализировали по 5 геле-слайдов, содержавших не менее 50 ДНК-комет в каждом.

Биомаркеры окислительного стресса

Пищеварительную железу мидий гомогенизировали при температуре 4°C в 0.05 М фосфатном буфере pH 7.4 (1 : 10, масса/объем), содержавшем 0.1 мМ фенолметансульфонилфторид (ингибитор протеаз), 1% Тритон X-100 и 1 мМ этилендиаминтетрауксусную кислоту. Гомогенаты центрифугировали в течение 30 мин при 15000 г и температуре 4°C. В полученных супернатантах определяли активность КАТ по скорости распада перекиси водорода (Regoli, Principato, 1995) и конъюгирующую активность GST в реакции с

субстратом 1-хлор-2,4-динитробензолом (Habig, Jakoby, 1981).

Содержание МДА определяли по цветной реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (Buege, Aust, 1978).

Концентрацию белка определяли модифицированным методом Лоури (Markwell et al., 1978).

Все измерения проводили на двухлучевом спектрофотометре UV-2550 с термостатированной ячейкой (Shimadzu) при температуре 20°C.

Интегрированный ответ биомаркеров (ИОБ)

ИОБ рассчитывали по предложенному ранее алгоритму (Sanchez et al., 2013). Этот подход систематизации данных основан на принципе отклонения от эталона (т.е. от контрольных значений). В качестве контрольных значений использовали данные, полученные для мидий из зал. Восток, который рассматривали как фоновую акваторию.

Статистический анализ

Статистическая обработка результатов выполнена с помощью программы Statistica 7. При оценке достоверности изменений биомаркеров использовали непараметрический критерий Манна–Уитни, $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Стабильность мембран лизосом

Согласно нашим данным, время удерживания нейтрального красного лизосомами у мидий из бухт Козьмина и Золотой Рог было соответственно в 1.5 и 2 раза значительно меньше, чем у мидий из зал. Восток (табл. 1, $n = 10$, $p < 0.05$).

Индекс генетического повреждения

Анализ отдельных классов ДНК-комет показал, что в пищеварительной железе мидий из зал. Восток более 85% комет принадлежали к классам C0 и C1 с неповрежденной или мало поврежденной ДНК (рис. 1). У мидий из бухт Козьмина и Золотой Рог доля ДНК-комет, принадлежавших к классам C0 и C1, была меньше, чем у моллюсков из зал. Восток, соответственно на 5 и 20%, а доля комет, относившихся к классу с сильно поврежденной ДНК (C3), выше на 1.7 и 14.75% соответственно (рис. 1). Кроме этого, у мидий из бухт Козьмина и Золотой Рог были отмечены ДНК-кометы с критическим уровнем повреждения ДНК (C4): 0.33 и 4.25% соответственно. Согласно рассчитанным на основе этих данных ИГП (табл. 1), исследуемые акватории располагаются следующим образом: зал. Восток < б. Козьмина < б. Золотой Рог.

Таблица 1. Биологические показатели *Mytilus trossulus* из разных акваторий зал. Петра Великого Японского моря (среднее значение \pm стандартное отклонение)

Акватория	Длина, мм	Биомаркер					
		СМЛ	ИГП	КАТ	ГСТ	МДА	ИК
Зал. Восток	26.4–38.8	78.9 \pm 17.9	0.64 \pm 0.06	49.1 \pm 5.5	161.7 \pm 13.8	77.7 \pm 9.5	50.5 \pm 14.1
Б. Козьмина	26.3–38.9	51.8 \pm 22.6*	0.79 \pm 0.23	60.3 \pm 5.2*	240.0 \pm 29.0*	64.2 \pm 6.0*	33.3 \pm 9.6*
Б. Золотой Рог	23.4–32.2	40.5 \pm 23.4*	1.16* \pm 0.23	56.0 \pm 6.7	236.8 \pm 16.9*	58.3 \pm 4.5*	38.8 \pm 5.9*

Примечание. СМЛ – стабильность мембран лизосом, мин; ИГП – индекс генетического повреждения; КАТ – активность каталазы, мкмоль/мин/мг белка; ГСТ – активность глутатион-S-трансферазы, нмоль/мин/мг белка; МДА – содержание малонового диальдегида, нмоль/мг белка; ИК – индекс кондиции. *Достоверность различий относительно зал. Восток; критерий Манна–Уитни, $p < 0.05$

Биомаркеры окислительного стресса

В пищеварительной железе мидий из б. Козьмина активность КАТ и ГСТ была соответственно в 1.2 и 1.5 раза выше, чем у моллюсков из зал. Восток; у мидий из б. Золотой Рог активность КАТ отличалась незначительно, а активность ГСТ также была в 1.5 раза выше, чем у мидий из зал. Восток (табл. 1) ($n = 5$, $p < 0.05$).

Содержание МДА в пищеварительной железе мидий из бухт Козьмина и Золотой Рог оказалось соответственно в 1.2 и 1.3 раза ниже, чем у мидий из зал. Восток (табл. 1) ($n = 5$, $p < 0.05$).

Индекс кондиции

Согласно полученным морфометрическим данным (табл. 1, длина раковины), возраст исследованных мидий не превышал одного года. Индекс кондиции у мидий из бухт Козьмина и Золотой Рог был значимо соответственно в 1.5 и 1.3 раза меньше, чем у мидий из зал. Восток (табл. 1) ($n = 25$, $p < 0.05$).

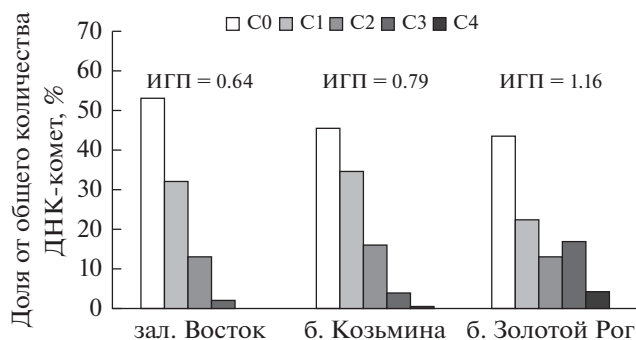


Рис. 1. Распределение ДНК-комет по классам в пищеварительной железе мидии *Mytilus trossulus* из разных акваторий (класс C0 – меньше 5% фрагментированной ДНК; класс C1 – 5–20%; C2 – 20–40%; C3 – 40–75%; C4 – больше 75%). ИГП – индекс генетического повреждения.

Интегрированный ответ биомаркеров

Рассчитанные значения ИОБ для мидий из зал. Восток, бухт Козьмина и Золотой Рог составили соответственно 0, 6.53 и 9.14. Графическое изображение полученных значений (рис. 2) наглядно отражает поведение отдельных биомаркеров и их отклонение от контроля. Область выше ноля показывает индукцию биомаркеров, ниже ноля – их ингибирование.

ОБСУЖДЕНИЕ

Стабильность мембран лизосом

Лизосомы – это органеллы, присутствующие во всех эукариотических клетках; они выполняют функцию изоляции и деградации отработавших и поврежденных макромолекул, а также токсичных для клетки веществ органической и неорганической природы. Патологическое изменение целостности мембран лизосом – важнейший биомаркер токсического воздействия на клеточном уровне (Dagnino et al., 2007; Martinez-Gómez et al.,

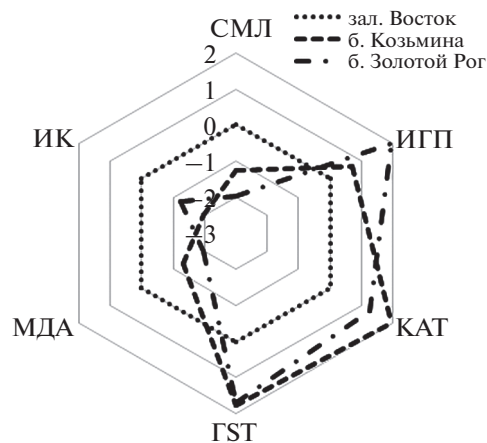


Рис. 2. Графическое представление интегрированного ответа биомаркеров в пищеварительной железе мидии *Mytilus trossulus* из разных акваторий. Обозначения биомаркеров, как в табл. 1.

2015). Известно, что дестабилизация мембран лизосом происходит в ответ на действие органических загрязнителей и тяжелых металлов (Lowe et al., 1995; Regoli et al., 1998; Moore, 2004). В результате повреждения мембран лизосом высвобождаются гидролитические ферменты и накопленные токсические вещества, что приводит к необратимым патологическим изменениям и гибели клетки (Kurz et al., 2008).

В соответствии с методом определения СМЛ приняты следующие критерии оценки физиологического состояния организмов: СМЛ ≥ 120 мин – здоровые организмы; $120 \text{ мин} > \text{СМЛ} \geq 50$ мин – находящиеся в состоянии компенсаторной адаптации; СМЛ < 50 мин – находящиеся в состоянии патологии (Martinez-Gómez et al., 2015).

Согласно этим критериям оценки, мидии из б. Золотой Рог испытывают высокий уровень стресса (патологическое состояние), а мидии из б. Козьмина и зал. Восток подвержены умеренному стрессу и находятся в состоянии компенсаторной адаптации.

Индекс генетического повреждения

Результаты оценки уровня повреждения молекулы ДНК показали, что в пищеварительной железе мидий из бухт Козьмина и Золотой Рог присутствовали ДНК-кометы, относящиеся к классам С3 (высокое повреждение) и С4 (экстремально высокое). Это свидетельствует о нарушении способности регуляторных систем клетки репарировать вызванные загрязнением повреждения ДНК (Bjelland, Seeberg, 2003). Можно предположить, что постепенное накопление повреждений в структуре молекулы ДНК и несостоятельность системы репарации, угнетенной действием антропогенного пресса, способны привести к возникновению ошибок в структуре ДНК, к появлению мутаций и гибели клеток у моллюсков, обитающих в бухтах Козьмина и Золотой Рог.

Биомаркеры окислительного стресса

По сравнению с мидиями из фонового зал. Восток, у мидий из загрязненных акваторий наблюдалась более высокая активность антиоксидантных ферментов. Такая реакция предполагает некоторые адаптивные и компенсаторные механизмы, действующие при хроническом загрязнении, и ранее была показана для *Mytilus galloprovincialis*, *Perna perna*, *Mytella guyanensis* и *Crenomytilus grayanus* (Bainy et al., 2000; Nasci et al., 2002; Torres et al., 2002; Бельчева и др., 2013; Benali et al., 2015).

Известно, что ответ фермента на действие токсических веществ демонстрирует тренд колоколообразной формы: сначала увеличение активности за счет активации синтеза, а затем ее уменьшение из-за усиления катаболизма и/или

прямого ингибиторного действия токсических веществ на молекулу фермента (Regoli, Principato, 1995; Frenzilli et al., 2004; Dagnino et al., 2007). В нашем случае активация GST и KAT у мидий из загрязненных акваторий, возможно, связана с формированием устойчивости к стрессовым условиям обитания.

Анализ содержания МДА в пищеварительной железе мидий показал, что его количество ниже у животных из загрязненных акваторий. На фоне увеличенной активности GST и KAT это также может отражать адаптацию к хроническому воздействию загрязняющих веществ. Аналогичные результаты были получены для *M. galloprovincialis* и *C. grayanus*, у которых в загрязненных акваториях активность антиоксидантных ферментов в пищеварительной железе и жабрах увеличилась, а содержание МДА не изменилось (Vox et al., 2007; Бельчева и др., 2013).

Возможно, такая защитная реакция компонентов антиоксидантной системы характерна для представителей семейства Mytilidae и свидетельствует об их лучшей приспособленности к существованию в условиях загрязнения окружающей среды. Известно, что у менее устойчивого к загрязнению японского гребешка *Chlamys farreri* в ответ на комплексное загрязнение среды обитания может происходить как активация, так и ингибирование антиоксидантных ферментов, а содержание продуктов перекисного окисления липидов в тканях увеличивается (Guo et al., 2017).

Индекс кондиции

Показатель “индекс кондиции” обычно используется в аквакультуре и экологическом мониторинге для оценки физиологического состояния мидий (Gagne et al., 2008; Benali et al., 2015). Рост, размножение и выживание двустворчатых моллюсков зависят от наличия достаточного запаса энергии в их организме. Воздействие загрязняющих веществ отрицательно сказывается на росте организма из-за высоких затрат энергии на процессы детоксикации вредных веществ (Nicholson, Lam, 2005). В связи с этим важность данного показателя особенно для быстрорастущей и короткоживущей мидии *M. trossulus* необходимо отметить.

Как правило, индекс кондиции у аборигенных и пересажённых в загрязненную акваторию мидий ниже, чем у моллюсков из условно чистой воды (Regoli et al., 1998; Guerlet et al., 2010). Однако известны и обратные примеры, что можно объяснить влиянием на ИК таких естественных факторов среды, как температура, доступность пищи и репродуктивный цикл (Vox et al., 2007; Benali et al., 2015).

Согласно нашим данным, ИК у *M. trossulus* из загрязненных бухт Козьмина и Золотой Рог был значимо ниже, чем у моллюсков из фоновой акватории зал. Восток. Очевидно, это связано с токсическим влиянием тяжелых металлов и других загрязнителей на стабильность мембраны лизосом органов пищеварительной системы моллюска, что приводит к низкому усвоению питательных веществ (Nicholson, 1999). На примере митилиды *Perna viridis* из загрязненной акватории показаны цитопатологические изменения морфологии жабр и пищеварительной железы, приводящие к потере важных физиологических функций этих органов (Vasanthi et al., 2017). Таким образом, ИК связывает реакции биомаркеров клеточного, тканевого и организменного уровней биологической организации и в определенной мере отражает нарушения физиологических функций, вызванных загрязнением.

Интегрированный ответ биомаркеров

Все исследованные в данной работе биомаркеры показали ответ, который индуцирован или ингибирован относительно значений фоновой акватории. Пространственное расположение реакции биомаркеров в виде диаграммы (рис. 2) позволило визуализировать их ответ и чувствительность. Согласно результатам наших исследований, наиболее чувствительными биомаркерами являются стабильность мембран лизосом, индекс генетического повреждения, активность GST и индекс кондиции.

Полученные значения ИОБ для зал. Восток, бухт Козьмина и Золотой Рог составили соответственно 0, 6.53 и 9.14. Считается, что приближение ИОБ к значению 10 (существенное отклонение от нулевого значения) свидетельствует о сильном загрязнении водной среды (Sanchez et al., 2013). Следовательно, рассчитанный интегральный показатель подтверждает известную степень загрязнения выбранных акваторий, возрастающую в ряду зал. Восток < б. Козьмина < б. Золотой Рог.

Таким образом, предложенный подход объединения реакции биомаркеров достаточно эффективен для оценки качества водной среды и ранжирования акваторий по степени загрязнения. В дальнейшем в целях проведения масштабного мониторинга необходимо определить естественную вариативность базовых уровней чувствительных биомаркеров у широкого ряда видов гидробионтов из фоновых акваторий с различными гидрологическими характеристиками.

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 при финансовой поддержке гранта РФФИ в рамках научного проекта № 19-35-90015 и при частичной поддержке госбюджетной темы НИР ТОИ ДВО РАН (№ 121-21500052-9).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Барышева В.С., Чернова Е.Н., Патрушева О.В. Загрязнение морской среды залива Восток Японского моря органическими веществами (2016–2018 гг.) // Вестн. ДВО РАН. 2019. № 2. С. 87–94.
- Бельчева Н.Н., Истомина А.А., Кудряшова Ю.В., Челомин В.П. Оценка качества морской среды по показателям окислительного стресса и содержанию тяжелых металлов в тканях мидии Грея *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) (Bivalvia: Mytilidae) // Биол. моря. 2013. Т. 39. № 4. С. 281–286.
- Бойченко Т.В. Химико-экологическая и микробиологическая оценка качества морских поверхностных вод южного Приморья: Автореф. дис. ... к. б. н. Владивосток. 2009. 24 с.
- Звягинцев А.Ю. Морское обрастание в северо-западной части Тихого океана. Владивосток: Дальнаука. 2005. 432 с.
- Качество морских вод по гидрохимическим показателям. Ежегодник 2016. М.: Наука. 2017. 285 с.
- Качество морских вод по гидрохимическим показателям. Ежегодник 2017. М.: Наука. 2018. 295 с.
- Качество морских вод по гидрохимическим показателям. Ежегодник 2018. М.: Наука. 2019. 287 с.
- Слободскова В.В., Кукла С.П., Челомин В.П. Анализ качества морской среды на основе определения генотоксичности ДНК клеток жабр приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1856) // Биол. моря. 2015. Т. 41. № 6. С. 457–460.
- Сокольникова Ю.Н., Трубецкая Е.В., Беленева И.А. и др. Флуоресцентный анализ реакций *in vitro* фагоцитоза как эффективный метод оценки активности гемцитов двустворчатого моллюска *Modiolus kurlensis* (Bernard, 1983) из фоновых и импактной акваторий // Биол. моря. 2015. Т. 41. № 2. С. 122–129.
- Чернова Е.Н. Изменение концентрации металлов в тканях мидии *Mytilus edulis* из Белого моря в ходе репродуктивного цикла // Биол. моря. 2010. Т. 36. № 1. С. 63–69.
- Al-Fanharawi A.A., Rabee A.M., Al-Mamoori A.M.J. Biochemical and molecular alterations in freshwater mollusks as biomarkers for petroleum product, domestic heating oil // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2018. V. 158. P. 69–77.
- Bainy A.C.D., Almeida E.A., Müller I.C. et al. Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil // Mar. Environ. Res. 2000. V. 50. P. 411–416.

- Benali I., Boutiba Z., Merabet A., Chèvre N. Integrated use of biomarkers and condition indices in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) for monitoring pollution and development of biomarker index to assess the potential toxic of coastal sites // Mar. Pollut. Bull. 2015. V. 95. № 1. P. 385–394.
- Bendell-Young L.I., Arifin Z. Application of a kinetic model to demonstrate how selective feeding could alter the amount of cadmium accumulated by the blue mussel (*Mytilus trossulus*) // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2004. V. 298. P. 21–33.
- Bjelland S., Seeberg E. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation // Mutat. Res. 2003. V. 531. № 1–2. P. 37–80.
- Blanchette B., Fend X., Singh B.R. Marine glutathione S-transferases // Mar. Biotechnol. (NY). 2007. V. 9. № 5. P. 513–542.
- Box A., Sureda A., Galgani F. et al. Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis* // Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol. 2007. V. 146. № 4. P. 531–539.
- Buege J.A., Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation // Methods Enzymol. 1978. V. 52. P. 302–310. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(78)52032-6)
- Chelomin V.P., Belcheva N.N. Alterations of microsomal lipid synthesis in gill cells of bivalve mollusk *Mizuhopecten yessoensis* in response to cadmium accumulation // Comp. Biochem. Physiol. C: Comp. Pharmacol. 1991. V. 99. P. 1–5.
- Dagnino A., Allen J.I., Moore M.N. et al. Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index // Biomarkers. 2007. V. 12. № 2. P. 155–172.
- Damiens G., Gnassia-Barelli M., Loquès F. et al. Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels // Chemosphere. 2007. V. 66. № 3. P. 574–583.
- Frenzilli G., Nigro M., Scarcelli V. et al. DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*: a field study in a highly eutrophicated coastal lagoon // Aquat. Toxicol. 2001. V. 53. № 1. P. 19–32.
- Frenzilli G., Bocchetti R., Pagliarecci M. et al. Time-course evaluation of ROS-mediated toxicity in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment // Mar. Environ. Res. 2004. V. 58. № 2–5. P. 609–613.
- Gagne F., Burgeot T., Hellou J. et al. Spatial variations in biomarkers of *Mytilus edulis* mussels at four polluted regions spanning the Northern Hemisphere // Environ. Res. 2008. V. 107. № 2. P. 201–217.
- González-Fernández C., Albentosa M. et al. Effect of mussel reproductive status on biomarker responses to PAHs: Implications for large-scale monitoring programs // Aquat. Toxicol. 2016. V. 177. P. 380–394.
- Guerlet E., Vasseur P., Giamberini L. Spatial and temporal variations of biological responses to environmental pollution in the freshwater zebra mussel // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2010. V. 73. № 6. P. 1170–1181.
- Guo R., Pan L., Ji R. A multi-biomarker approach in scallop *Chlamys farreri* to assess the impact of contaminants in Qingdao coastal area of China // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2017. V. 142. P. 399–409.
- Habig W.H., Jakoby W.B. Assay for differentiation of glutathione-S-transferases // Methods Enzymol. 1981. V. 77. P. 398–405.
- Halliwel B., Gutteridge J.M.C. Free radicals in biology and medicine, 4th ed. Oxford: Oxford Univ. Press. 2007. 704 p.
- Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. Glutathione transferases // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2005. V. 45. P. 51–88.
- Kurz T., Terman A., Gustafsson B., Brunk U.T. Lysosomes and oxidative stress in aging and apoptosis // Biochim. Biophys. Acta. 2008. V. 1780. № 11. P. 1291–1303. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.01.009>
- Lehtonen K.K., Turja R., Budzinski H., Devier M.H. An integrated chemical-biological study using caged mussels (*Mytilus trossulus*) along a pollution gradient in the Archipelago Sea (SW Finland, Baltic Sea) // Mar. Environ. Res. 2016. V. 119. P. 207–221.
- Lompré J.S., Malanga G., Gil M.N., Giarratano E. Multiple-biomarker approach in a commercial marine scallop from San Jose gulf (Patagonia, Argentina) for health status assessment // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2020. V. 78. № 3. P. 451–462.
- Lowe D.M., Fossato V.U., Depledge M.H. Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Venice Lagoon: An *in vitro* study // Mar. Ecol.: Prog. Ser. 1995. V. 129. P. 189–196.
- Lushchak V.I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. // Aquat. Toxicol. 2011. V. 101. № 1. P. 13–30.
- Maria V.L., Bebianno M.J. Antioxidant and lipid peroxidation responses in *Mytilus galloprovincialis* exposed to mixtures of benzo(a)pyrene and copper // Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol. 2011. V. 154. № 1. P. 56–63.
- Markwell M.A., Haas S.M., Bieber L.L., Tolbert N.E. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples // Anal. Biochem. 1978. V. 87. № 1. P. 206–210.
- Martínez-Gómez C., Bignell J., Lowe D. Lysosomal membrane stability in mussels // ICES Tech. Mar. Environ. Sci. 2015. V. 56. P. 41.
- Mitchelmore C.L., Chipman J.K. Detection of DNA strand breaks in brown trout (*Salmo trutta*) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay // Aquat. Toxicol. 1998. V. 41. P. 161–182.
- Moore M.N. Diet restriction induced autophagy: A lysosomal protective system against oxidative- and pollutant-stress and cell injury // Mar. Environ. Res. 2004. V. 58. P. 603–607.
- Nasci C., Nesto N., Monteduro R., Da Ros L. Field application of biochemical markers and a physiological index in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*: transplantation and biomonitoring studies in the lagoon of Venice (NE Italy) // Mar. Environ. Res. 2002. V. 54. P. 811–816.
- Nicholson S. Cytological and physiological biomarker responses from green mussels, *Perna viridis* (L.) trans-

- planted to contaminated sites in Hong Kong coastal waters // *Mar. Pollut. Bull.* 1999. V. 39. P. 261–268.
- Nicholson S., Lam P.K.S. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia) // *Environ. Int.* 2005. V. 31. № 1. P. 121–132.
- Pempkowiak J., Pazdro K., Kopecka J. et al. Toxicants accumulation rates and effects in *Mytilus trossulus* and *Nereis diversicolor* exposed separately or together to cadmium and PAHs // *J. Environ. Sci. Health, Part A: Environ. Sci. Eng. Toxic Hazard. Subst. Control.* 2006. V. 41. P. 2571–2586.
- Regoli F., Principato G. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers // *Aquat. Toxicol.* 1995. V. 31. № 2. P. 143–164.
- Regoli F., Nigro M., Orlando E. Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki* // *Aquat. Toxicol.* 1998. V. 40. P. 375–392.
- Regoli F., Frenzilli G., Bocchetti R. et al. Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment // *Aquat. Toxicol.* 2004. V. 68. P. 167–178.
- Sanchez W., Burgeot T., Porcher J.M. A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2013. V. 20. P. 2721–2725.
- She Y.M., Narindrasorasak S., Yang S. et al. Identification of metal-binding proteins in human hepatoma lines by immobilized metal affinity chromatography and mass spectrometry // *Mol. Cell. Proteomics.* 2003. V. 2. P. 1306–1318.
- Storey K.B. Oxidative stress: animal adaptations in nature // *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1996. V. 29. № 12. P. 1715–1733.
- Torres M.A., Testa C.P., Gaspari C. et al. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil // *Mar. Pollut. Bull.* 2002. V. 44. P. 923–932.
- Vasanthi L.A., Revathi P., Babu Rajendran R., Munuswamy N. Detection of metal induced cytopathological alterations and DNA damage in the gills and hepatopancreas of green mussel *Perna viridis* from Ennore Estuary, Chennai, India // *Mar. Pollut. Bull.* 2017. V. 117. № 1–2. P. 41–49.
- Vethaak A.D., Davies I.M., Thain J.E. et al. Integrated indicator framework and methodology for monitoring and assessment of hazardous substances and their effects in the marine environment // *Mar. Environ. Res.* 2017. V. 124. P. 11–20.
- Vieira C.E.D., Almeida M.S., Galindo B.A. et al. Integrated biomarker response index using a Neotropical fish to assess the water quality in agricultural areas // *Neotrop. Ichthyol.* 2014. V. 12. № 1. P. 153–164.
- Yoshinaga M., Ueki T., Michibata H. Metal binding ability of glutathione transferases conserved between two animal species, the vanadium-rich ascidian *Ascidia sydneiensis samea* and the schistosome *Schistosoma japonicum* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1770. P. 1413–1418.

Integrated Response of Biomarkers in the Assessment of the Quality of the Marine Environment on the Example of the Bivalve Mollusk *Mytilus trossulus* (Gould, 1850)

A. A. Istomina^a, A. A. Mazur^a, V. P. Chelomin^a, S. P. Kukla^a, V. V. Slobodskova^a, A. Yu. Zvyagintsev^b, Yu. V. Fedorets^a, O. A. Yelovskaya^a, and L. F. Kolosova^a

^aV.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

^bA.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

The possibility of using a battery of biomarkers – the lysosomal membrane stability (LMS), the genetic damage index (GDI), the activities of catalase (CAT) and glutathione-S-transferase (GST), the level of malondialdehyde (MDA), and the condition index (CI) – was tested for the assessment of pollution in the marine environment. These characters were used to calculate the index reflecting integrated biomarker response (IBR). The obtained index confirmed the known degree of marine pollution that increases in a row Vostok Bay < Kozmina Bay < Golden Horn Bay.

Keywords: *Mytilus trossulus*, lysosomal membrane stability, genetic damage index, catalase, glutathione-S-transferase, condition index, integrated biomarker response

УДК 57.063.7

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МОРСКОГО БЛЮДЕЧКА *LOTTIA* CF. *BOREALIS* (PATELLOGASTROPODA: LOTTIIDAE) ИЗ ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ МОРЕЙ РОССИИ

© 2021 г. С. Н. Шарина^{1,*}, В. В. Маляр¹, А. В. Чернышев¹

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

*e-mail: sharina.svetlana@gmail.com

Поступила в редакцию 30.06.2020 г.

После доработки 17.12.2020 г.

Принята к публикации 18.12.2020 г.

Проведен генетический анализ широко распространенной в дальневосточных морях России гастроподы морское блюдечко *Lottia* cf. *borealis*. На основе трех генетических маркеров (*COI*, *16S*, *12S*) показано, что этот вид не обладает выраженной генетической структурой в исследованной части ареала (южное побережье Приморского края, побережья о-ва Сахалин и южных Курильских островов). Филогенетический анализ показал, что *Lottia* cf. *borealis* является сестринским таксоном по отношению к *L. paradigitalis* (Fritchman, 1960).

Ключевые слова: Японское море, Охотское море, популяция, *16S*, *12S*, *COI*

DOI: 10.31857/S0134347521030104

Одна из наиболее древних групп ныне живущих гастропод – морские блюдечки подкласса Patellogastropoda (Lindberg, 1988; Harasewych, McArthur, 2000; Nakano, Ozawa, 2007; Uribe et al., 2019) широко распространены в Мировом океане и обитают преимущественно на мелководье. Морские блюдечки заселяют разные субстраты и играют важную роль в морской экосистеме (Lindberg, 2008; Nakano et al., 2009; González-Wevar et al., 2019). Пателлогастроподы широко используются как модельные организмы в эволюционных исследованиях (Giesel, 1970; Hockey et al., 1987; Byers, 1989; Espoz, Castilla, 2000), при изучении экологии, эмбриологии, популяционной генетики и биогеографии (Abbott et al., 1968; Hodgson et al., 1996; Koufopanou et al., 1999).

Lottia Gray, 1833 (= *Collisella* Dall, 1871) – самый крупный по числу видов род пателлогастропод, который включает 66 валидных видов (<http://www.marinespecies.org/>), распространенных главным образом в бореальных и субтропических широтах Тихого океана. Первая ревизия видов рода *Lottia* из дальневосточных морей России была проведена Москалевым (1970). В таксономической ревизии комплекса видов “*Collisella heroldi*” Японии (Sasaki, Okutani, 1994) были использованы признаки раковины (прежде всего ее скульптуры), радулы и челюстей, что было принято и при ревизии видов рода *Lottia* из дальневосточных морей России (Чернышев, Чернова, 2004, 2005, 2007).

Однако у морских блюдечек многие признаки раковины (например, форма и окраска) крайне вариабельны, а строение радулы не может быть использовано для идентификации близких видов. Вероятно, поэтому применение традиционных морфологических подходов часто приводит к таксономическим ошибкам (Harasewych, McArthur, 2000; Nakano, Spencer, 2007; Johnson et al., 2008; Nakano, Sasaki, 2011; Yu et al., 2014; Sharina et al., 2016). Вместе с тем относительно простая по морфологическим признакам анатомия морских блюдечек может быть причиной переоценки фактического разнообразия группы (Lindberg, 2008; González-Wevar et al., 2019) или, наоборот, невозможности разграничения криптических видов (Simison, Lindberg, 2003; Crummett, Eernisse, 2007; Nakano, Ozawa, 2007; Evans, Paulay, 2012; Nakayama et al., 2017).

В последние два десятилетия для выяснения филогенетических отношений (Koufopanou et al., 1999; Nakano, Ozawa, 2004, 2007; Goldstien et al., 2006), идентификации видов (Hebert et al., 2003; Yu et al., 2014), выявления криптических видов (Simison, Lindberg, 1999, 2003; Nakano, Ozawa, 2005; Nakano, Spencer, 2007; Johnson et al., 2008; Nakano et al., 2009), установления границ (Nieuwerkerken et al., 2012), а также для изучения популяционной структуры видов активно используются молекулярно-генетические методы. К тому же молекулярные маркеры позволяют отличить

межвидовые морфологические различия от высокой внутривидовой изменчивости и фенотипической пластичности (Simison, Lindberg, 1999; Narasewych, McArthur, 2000; Nakano, Sasaki, 2011; Sharina et al., 2016; González-Wevar et al., 2019).

Однако, несмотря на широкое использование молекулярных маркеров, в настоящее время отсутствуют данные, позволяющие оценить генетическое разнообразие и определить границы видов рода *Lottia* в дальневосточных морях России. Цель нашего исследования — анализ генетического разнообразия и родственных связей широко распространенного и вариабельного вида *Lottia cf. borealis* с помощью молекулярных маркеров мтДНК (*COI*, *16S*, *12S*). Выбор вида обусловлен тем, что его таксономический статус до сих пор не ясен. В литературе вид известен под названиями *Collisella radiata* (Москалев, 1970; Голиков, Кусакин, 1978), *Collisella borealis* (см.: Lindberg, 1982), *Lottia borealis* (см.: Lindberg, 1986), *Lottia cf. borealis* (см.: Sasaki, 1999), *Lottia paradigitalis* (см.: Simison, Lindberg, 2003) и *Lottia persona* (Чернышев, 2004; Чернышев, Чернова, 2005, 2007). Установить приоритетное название лишь с помощью морфологических методов не представляется возможным.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Для изучения биоразнообразия морского блюдечка *Lottia cf. borealis* использовали 52 особи из 13 географических локаций Дальнего Востока России (рис. 1, табл. 1). Раковины и ткани образцов хранятся в Лаборатории генетики Национального научного центра морской биологии ДВО РАН. Препараты ДНК получены из фиксированных 96% этанолом тканей головы и ноги животных с использованием набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, США).

При выборе молекулярных маркеров для данного исследования мы руководствовались следующим: во-первых, гены мтДНК эволюционируют быстрее, чем ядерные гены (Vawter, Brown, 1986; Corse et al., 2013), и это позволяет получить деревья с наилучшим разрешением для оценки филогенетических отношений на уровне рода; во-вторых, в геномном банке для видов рода *Lottia* имеется сравнительный материал.

Для анализа использовали фрагменты генов митохондриальной ДНК (мтДНК): субъединицы I цитохромоксидазы *c* (*COI*), а также малой (*12S*) и большой (*16S*) субъединиц рибосомальной РНК (рРНК). Фрагменты генов амплифицировали, применяя пары праймеров HCO2198/COI30L (*COI*) (Nakano, Ozawa, 2005), 16SarL/16SbrH (*16S*) (Kappner, Bieler, 2006) и 12S97L/12Smb (*12S*) (Koufopanou et al., 1999) при соответствующих

условиях полимеразной цепной реакции. Последовательности секвенировали, используя набор BrilliantDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Nimagen, Нидерланды), на генетическом анализаторе ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, США) согласно протоколу производителя. Последовательности фрагментов гена морского блюдечка *Lottia cf. borealis* депонировали в GenBank под номерами: MT678937–MT678989 (*COI*), MT677798–MT677849 (*16S*) и MT677751–MT677797 (*12S*) (табл. 1).

Множественное выравнивание и анализ полученных нуклеотидных последовательностей исследуемых фрагментов генов осуществляли в программе MEGA7 (Kumar et al., 2016) по алгоритму CLUSTAL W (Thompson et al., 1994). Для сравнения полученных данных в анализе использовали все видовое разнообразие рода *Lottia* из базы данных GenBank, NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), доступное для исследуемых маркеров. Генетическую дивергенцию оценивали на основании значений внутригрупповых и межгрупповых нескорректированных *p*-дистанций с помощью пакета MEGA7. Оптимальную модель нуклеотидного замещения подбирали в программе MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004), используя информационный критерий Акаике (AIC). Для визуализации разных филогрупп мтДНК по каждому генетическому маркеру в программе popArt 1.7.2 (Leigh, Bryant, 2015) строили медианные сети гаплотипов.

Байесовские филогенетические деревья (BI) реконструировали в программе MrBayes 3.2.7a (Ronquist et al., 2012) на базе высокопроизводительного сервера CIPRES (Miller et al., 2010) при следующих параметрах: 30 млн. итераций, модель нуклеотидного замещения SYM+G, отбор каждого тысячного из генерированных деревьев, значение burnin 25%. В качестве внешней группы для построений использовали последовательности *Notoacmea sturnus* (Hombron, Jacquinet, 1841) (AB353900) по *COI* и *Notoacmea pileopsis* (Quoy, Gaimard, 1834) (AB238373, AB238262) по *16S* и *12S* маркерам.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Длина последовательностей после выравнивания и приведения к одной длине составила 500 пар нуклеотидов (п.н.) для фрагмента гена *COI*, 286 п.н. для *16S* рРНК и 228 п.н. для *12S* рРНК.

На филогенетических деревьях, построенных на основании трех маркеров, все последовательности, принадлежащие одному виду, кластеризуются вместе. Топологии деревьев, построенных с использованием разных маркеров, в целом совпадают. В качестве основного мы рассматриваем дерево, построенное на основании последователь-

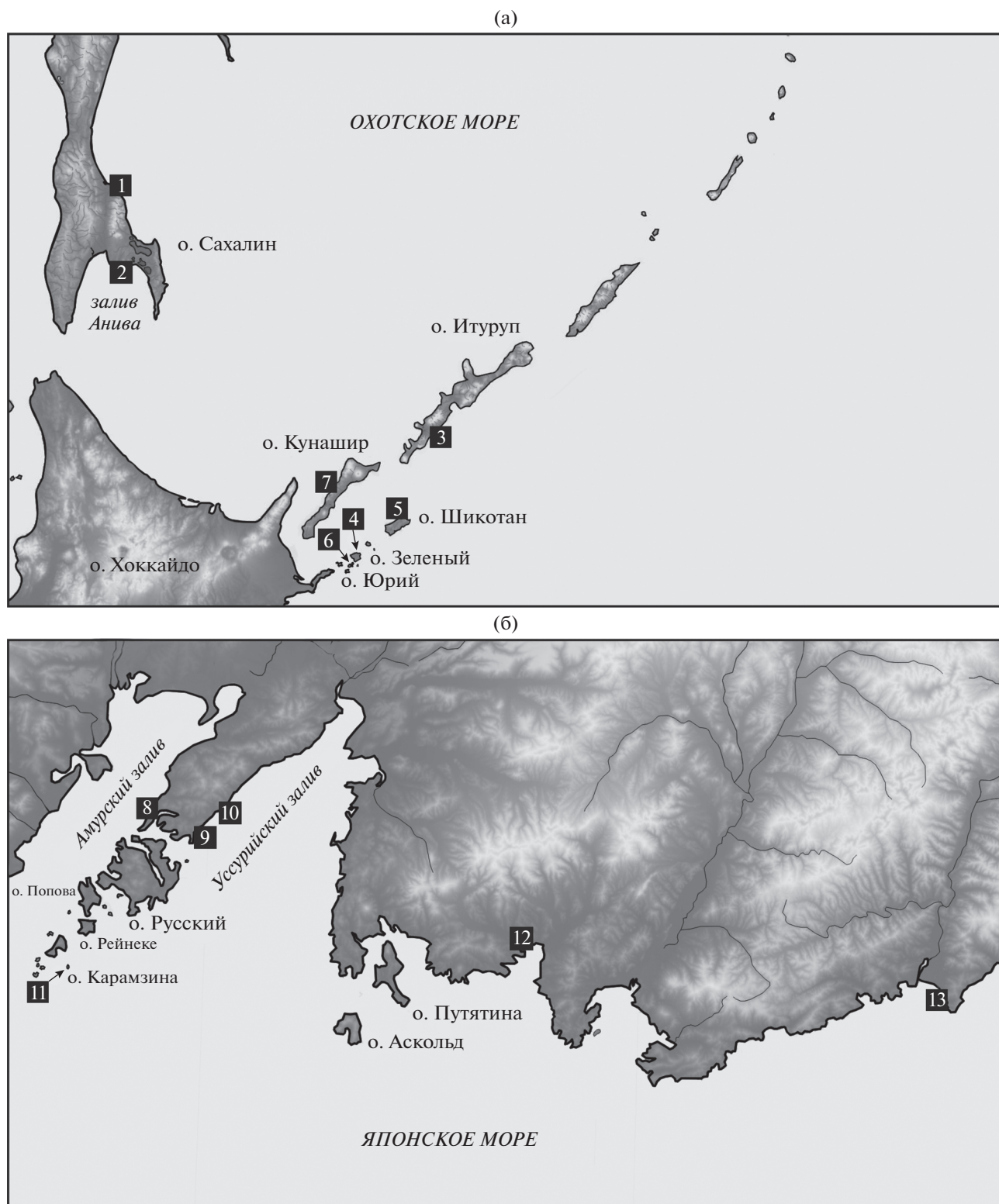


Рис. 1. Карта-схема мест сбора морского блюдечка *Lottia cf. borealis* в Охотском море (а) и на материковом побережье Японского моря (б). Условные обозначения: 1 – юго-восточное побережье о-ва Сахалин (Soh); 2 – зал. Анива (An1); 3 – о-в Итуруп (It); 4 – мыс Глушецкого, о-в Зеленый (KurG1); 5 – 6. Горобец, о-в Шикотан (KurGor); 6 – 6. Широкая, о-в Юрий (KurSh); 7 – о-в Кунашир (KurVal); 8 – Амурский залив (Am2); 9, 10 – Уссурийский залив (Т, Uss); 11 – о-в Карамзина (Kar); 12 – зал. Восток (V); 13 – б. Киевка (К). В скобках указано название выборки.

Таблица 1. Места сбора и номера доступа GenBank NCBI для особей *L. cf. borealis*, использованных в данном анализе

Номер пробы	Место сбора	COI	16S	12S
17–15.1 Soh	О-в Сахалин, Охотское море	MT678937	MT677798	MT677751
17–15.2 Soh	О-в Сахалин, Охотское море	MT678938	MT677799	MT677752
16–15.1 Soh	О-в Сахалин, Охотское море	MT678939	MT677800	MT677753
16–15.3 Soh	О-в Сахалин, Охотское море	MT678940	MT677801	MT677754
16–15.4 Soh	О-в Сахалин, Охотское море	MT678941	MT677802	MT677755
16–15.5 Soh	О-в Сахалин, Охотское море	MT678942	MT677803	MT677756
17–15.3 Soh	О-в Сахалин, Охотское море	MT678943	MT677804	–
18–15 Soh	О-в Сахалин, Охотское море	MT678944	MT677805	MT677757
19–15 Soh	О-в Сахалин, Охотское море	MT678945	MT677806	MT677758
20–15 Soh	О-в Сахалин, Охотское море	MT678946	MT677807	–
16–15.2 Soh	О-в Сахалин, Охотское море	MT678947	MT677808	MT677759
17–15.4 Soh	О-в Сахалин, Охотское море	MT678948	MT677809	MT677760
17–15.5 Soh	О-в Сахалин, Охотское море	MT678949	MT677810	MT677761
Lottia An1	Мыс Юнона, зал. Анива, о-в Сахалин, Охотское море	MT678950	MT677811	MT677762
25–28.01.12 It	О-в Итуруп, Курильские острова, Охотское море	MT678951	MT677812	MT677763
17 KurGl	Мыс Глушевского, о-в Зеленый, Курильские острова, Охотское море	MT678952	MT677813	MT677764
30 KurGor	Б. Горобец, о-в Шикотан, Курильские острова, Охотское море	MT678953	MT677814	MT677765
10 KurGor	Б. Горобец, о-в Шикотан, Курильские острова, Охотское море	MT678954	MT677815	MT677766
11 KurGor	Б. Горобец, о-в Шикотан, Курильские острова, Охотское море	MT678955	MT677816	MT677767
27 KurGor	Б. Горобец, о-в Шикотан, Курильские острова, Охотское море	MT678956	MT677817	MT677768
28 KurGor	Б. Горобец, о-в Шикотан, Курильские острова, Охотское море	MT678957	MT677818	MT677769
7 KurSh	Б. Широкая, о-в Юрий, Курильские острова, Охотское море	MT678958	MT677819	MT677770
23 KurVal	О-в Кунашир, Курильские острова, Охотское море	MT678959	MT677820	MT677771
31 KurVal	О-в Кунашир, Курильские острова, Охотское море	MT678960	MT677821	MT677772
24 KurVal	О-в Кунашир, Курильские острова, Охотское море	MT678961	MT677822	MT677773
II–17 Am2	Спортивная гавань, Амурский залив, зал. Петра Великого, Японское море	MT678962	MT677823	MT677774
III–28 Am2	Спортивная гавань, Амурский залив, зал. Петра Великого, Японское море	MT678963	MT677824	MT677775
II–18 Am2	Спортивная гавань, Амурский залив, зал. Петра Великого, Японское море	MT678964	MT677825	MT677776
3–19 T	Б. Сухопутная, Уссурийский залив, зал. Петра Великого, Японское море	MT678965	MT677826	–

Таблица 1. Окончание

Номер пробы	Место сбора	COI	16S	12S
2-19 T	Б. Сухопутная, Уссурийский залив, зал. Петра Великого, Японское море	MT678966	MT677827	—
3-XXII-09 Uss	Уссурийский залив, зал. Петра Великого, Японское море	MT678967	MT677828	MT677777
22-17.1 Uss	Уссурийский залив, зал. Петра Великого, Японское море	MT678968	MT677829	MT677778
II-23 Uss	Уссурийский залив, зал. Петра Великого, Японское море	MT678969	MT677830	MT677779
2-XXII-09 Uss	Уссурийский залив, зал. Петра Великого, Японское море	MT678970	MT677831	MT677780
6-XXII-09 Uss	Уссурийский залив, зал. Петра Великого, Японское море	MT678971	MT677832	MT677781
III-25 Uss	Уссурийский залив, зал. Петра Великого, Японское море	MT678972	MT677833	MT677782
4-XXII-09 Uss	Уссурийский залив, зал. Петра Великого, Японское море	MT678973	MT677834	MT677783
III-26 Uss	Уссурийский залив, зал. Петра Великого, Японское море	MT678974	MT677835	MT677784
V-12 Uss	Уссурийский залив, зал. Петра Великого, Японское море	MT678975	MT677836	MT677785
22-17.2 Uss	Уссурийский залив, зал. Петра Великого, Японское море	MT678976	MT677837	MT677786
24-28.01.12 Uss	Уссурийский залив, зал. Петра Великого, Японское море	MT678977	MT677838	—
II-24 Uss	Уссурийский залив, зал. Петра Великого, Японское море	MT678978	MT677839	MT677787
5-XXII-09 Uss	Уссурийский залив, зал. Петра Великого, Японское море	MT678979	MT677840	MT677788
7-XXII-09 Uss	Уссурийский залив, зал. Петра Великого, Японское море	MT678980	MT677841	MT677789
8-XXII-09 Uss	Уссурийский залив, зал. Петра Великого, Японское море	MT678981	MT677842	MT677790
23-28.01.12 Uss	Уссурийский залив, зал. Петра Великого, Японское море	MT678982	MT677843	MT677791
23-15.3 Kar	Северо-восточная часть о-ва Карамзина	MT678983	MT677844	MT677792
23-15.1 Kar	О-в Карамзина, зал. Петра Великого, Японское море	MT678984	MT677845	MT677793
23-15.5 Kar	О-в Карамзина, зал. Петра Великого, Японское море	MT678985	MT677846	MT677794
23-15.2 Kar	О-в Карамзина, зал. Петра Великого, Японское море	MT678986	MT677847	MT677795
21-28.01.12 V	Зал. Восток, зал. Петра Великого, Японское море	MT678987	MT677848	MT677796
443-09 K	Б. Киевка, Японское море	MT678988	MT677849	MT677797

ностей гена *COI*, поскольку количество последовательностей, доступных для анализа в геномной базе для данного маркера, было наибольшим

(рис. 2). Практически все узлы филограммы разрешены, однако не во всех случаях имеются достаточно высокие поддержки ветвей ($PP < 0.95$).

Таблица 2. Среднее генетическое расстояние (p) и стандартная ошибка (SE) внутри и между кладами филогенетических деревьев по данным последовательностей мтДНК

	<i>COI</i>	<i>16S</i>	<i>12S</i>
<i>L. cf. borealis</i> – <i>L. paradigitalis</i>	0.173 ± 0.017	0.0631 ± 0.0136	–
<i>L. cf. borealis</i>	0.0018 ± 0.0005	0.0031 ± 0.0013	0.0071 ± 0.0035
<i>L. paradigitalis</i> *	0.00054 ± 0.00036	–	–

*Внутривидовые дистанции считали для всех особей *L. paradigitalis*, доступных в геномном банке.

Дерево, построенное на основании гена большой субъединицы рРНК (*16S*), в целом имеет сходную топологию, однако на нем присутствуют неразрешенные ветви. Филограмма, реконструированная на основании гена малой субъединицы рРНК (*12S*), имеет большое количество неразрешенных узлов и не может считаться достоверной. На всех филогенетических деревьях последовательности видов рода *Notoacmea* Iredale, 1915 занимают базальное положение по отношению к таковым исследованных таксонов.

Клада *Lottia cf. borealis* включает все нуклеотидные последовательности, полученные нами, а также две последовательности *Lottia* sp. (LC416608 и LC416607) с о-ва Хоккайдо (Япония) из базы данных NCBI (поддержка клады PP = 1 по всем маркерам). Сестринским таксоном для этой клады на филограмме *COI* является *L. paradigitalis* (Fritchman, 1960) (PP = 0.9) (рис. 2). На филограмме по данным маркеров *16S* и *12S* ветвь *L. paradigitalis* не разрешена. Значения генетических дистанций между этими видами соответствуют межвидовому уровню (табл. 2).

Наибольшее количество гаплотипов обнаружено при анализе данных гена *COI*. Из 18 гаплотипов центральное положение занимает наиболее часто встречающийся и широко распространенный гаплотип Н4. Гаплотип включает особей из каждого крупного географического региона и формирует звездообразную структуру из 12 гаплотипов (18 особей), которые отличаются от центрального гаплотипа всего одной заменой. Гаплотипы Н1, Н2, Н3 и Н14 (6 особей) удалены на расстояние двух нуклеотидных замен; они включают по одному образцу из зал. Восток, с побережья о-ва Карамзина и о-ва Итуруп и 3 особи из Уссурийского залива. Наиболее удаленный гаплотип Н13 представлен одной особью из Уссурийского залива и отличается от центрального гаплотипа тремя нуклеотидными заменами (рис. 3). Наибольшее количество (9) гаплотипов обнаружено в выборках из Уссурийского залива, а также с побережья о-ва Сахалин (4 гаплотипа) и Курильских островов (3 гаплотипа).

При анализе генов рРНК выявлено значительно меньшее количество гаплотипов. По гену *16S* рРНК обнаружено всего 7 гаплотипов, из которых гаплотип Н1 является центральным (рис. 3).

Характерная звездообразная структура образована меньшим количеством гаплотипов, чем по данным гена *COI*, при этом количество нуклеотидных замен относительно больше. Так, гаплотип Н5 отличается от центрального гаплотипа тремя нуклеотидными заменами и включает по две особи с побережья Курильских островов и о-ва Сахалин, в то время как гаплотип Н4 (одна особь из б. Киевка) удален на 4 нуклеотидные замены. Гаплотип Н3 (7 особей с побережья Курильских островов и одна особь из б. Сухопутная) удален от центрального гаплотипа на две замены. Остальные гаплотипы, объединяющие по одной особи из Амурского залива (гаплотип Н2), с побережья о-ва Итуруп (Н6) и о-ва Сахалин (Н7), равноудалены на одну нуклеотидную замену. Наибольшее число гаплотипов характерно для выборок с побережья Курильских островов.

Анализ медианных сетей по данным фрагмента гена *12S* выявил 11 гаплотипов. Все обнаруженные гаплотипы, кроме центрального Н2, включают по одной особи *Lottia persona*. Наибольшее генетическое разнообразие наблюдалось в выборках с побережья Курильских островов (7 гаплотипов) и из Уссурийского залива (4 гаплотипа). Для гаплотипической сети по данному генетическому маркеру характерно также наличие альтернативных связей.

ОБСУЖДЕНИЕ

Морские блюдечки из дальневосточных морей, которые в настоящей работе приводятся как *Lottia cf. borealis*, в предыдущих работах назывались *Lottia borealis* (см.: Lindberg, 1986; Гульбин, 2004), *Lottia cf. borealis* (см.: Sasaki, 1999), *Lottia paradigitalis* (см.: Simison, Lindberg, 2003) и *Lottia persona* (Чернышев, 2004; Чернышев, Чернова, 2005, 2007). Проведенный нами анализ показал обособленность дальневосточных особей от *Lottia persona* (Rathke, 1833) с тихоокеанского побережья Северной Америки, штат Вашингтон, США (AB238477) (Nakano, Ozawa, 2007) и Британская Колумбия, Канада (MK091859, KX069642) (Castelin et al., 2016). Следует отметить, что распространенный у берегов Северной Америки вид, называемый *Lottia* (= *Tectura*) *persona* sensu Lindberg, по раковине отличается от типового экземпляра

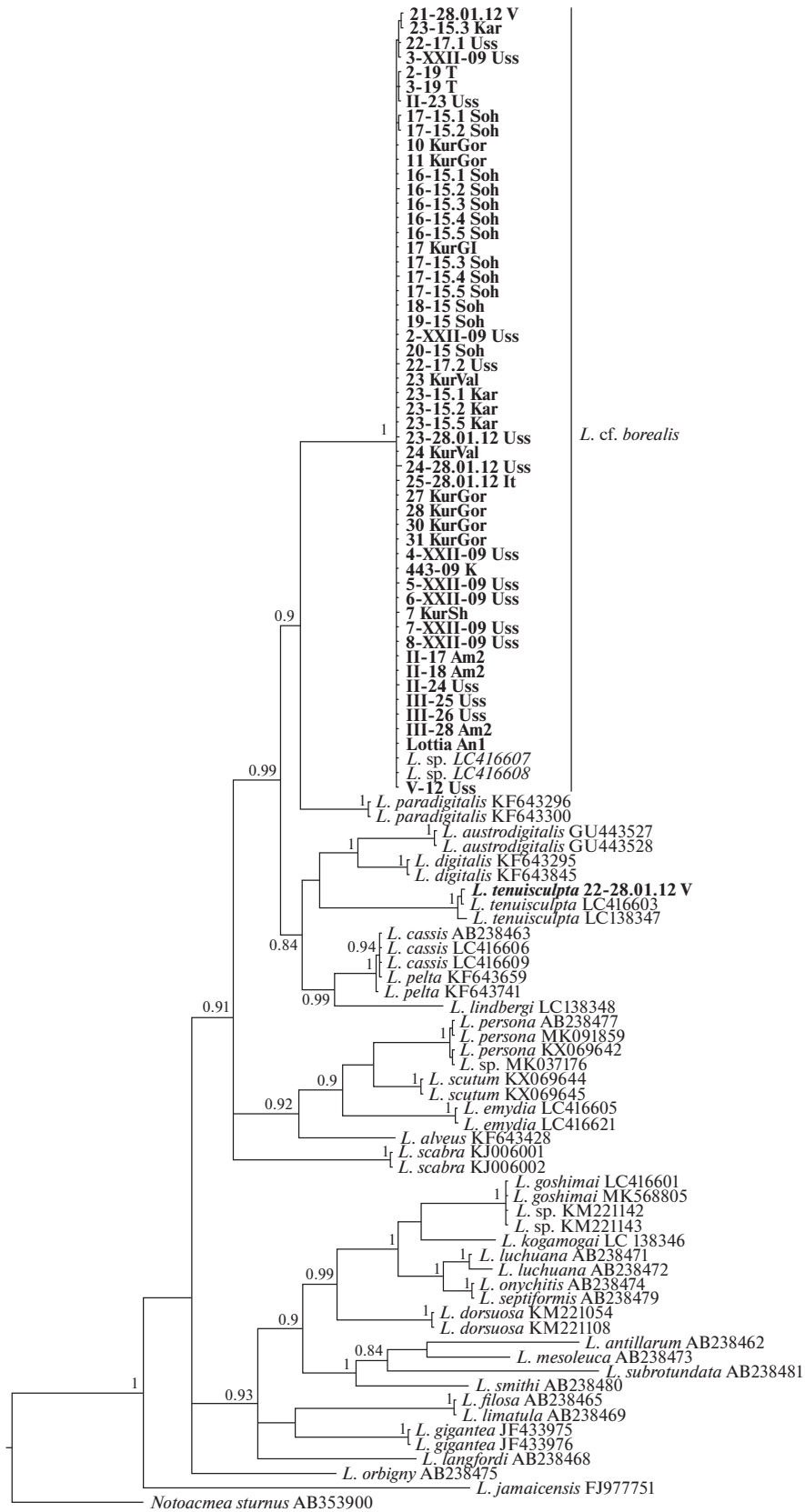


Рис. 2. Байесовское консенсусное филогенетическое дерево, построенное на основании нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *COI*, для видов рода *Lottia*. В узлах дерева указаны апостериорные вероятности. Последовательности, полученные нами, выделены жирным шрифтом, данные из NCBI – курсивом. Названия локаций, как на рис. 1.

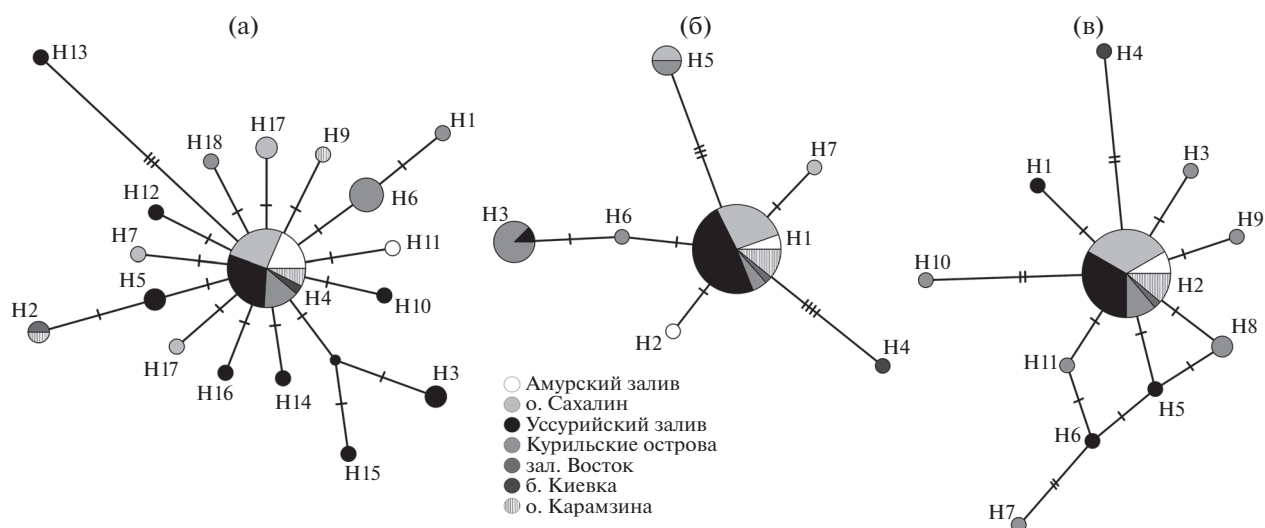


Рис. 3. Медианная гаплотипическая сеть, полученная на основании анализа нуклеотидных последовательностей генов *COI* (а), *16S* (б) и *12S* (в) *Lottia cf. borealis*.

Actaea persona Rathke, 1833, поэтому под названием “*persona*”, по-видимому, скрываются два вида (Чернышев, 2004). По результатам анализа *Lottia cf. borealis* и *L. paradigitalis* являются сестринскими таксонами (рис. 2), дистанция между которыми соответствует межвидовому уровню (табл. 2). Образцы *L. paradigitalis* (KF643296 и KF643300, NCBI), включенные в наш анализ, собраны вдоль тихоокеанского побережья США и Канады (Simison, Lindberg, 2003; Kelly, Palumbi, 2010; Layton et al., 2014). По форме и окраске раковины особи с Дальнего Востока больше похожи на вид *Lottia borealis*, описанный с побережья Алеутских островов, поэтому Линдберг (Lindberg, 1982) считал их конспецифичными. Позже на основе сравнения фрагментов *16S* вид *L. borealis* был синонимизирован с *L. paradigitalis* (см.: Simison, Lindberg, 2003). Однако авторы не привели фотографии отсеквенированных образцов с Алеутских островов, поэтому невозможно судить, насколько эти особи соответствуют первоописанию *L. borealis*. Какими бы не оказались раковины, изученные данными авторами, очевидно, что для синонимии *L. paradigitalis* и *L. borealis* необходимо привлечение большего числа особей с Алеутских островов и их генетический анализ на основе маркера *COI*. Очевидно, поэтому в WoRMS *L. borealis* приведен как валидный вид (<http://www.marinespecies.org/>). На данном основании до проведения более тщательного генетического анализа морских блюдечек с Алеутских островов, мы предлагаем называть особей из дальневосточных морей как *Lottia cf. borealis*.

От других дальневосточных морских блюдечек *Lottia cf. borealis* отличается скульптурой раковины, представленной очень тонкими широко рас-

ставленными и часто сдвоенными радиальными ребрышками (рис. 4д) (Чернышев, Чернова, 2007). Однако у большинства собранных особей скульптура раковины отсутствовала, и отнесение их к *Lottia cf. borealis* основывалось на форме сдвинутой в переднюю четверть слегка клювовидной вершины раковины, что не является надежным признаком. При этом окраска раковины сильно варьировала (рис. 4а–4г) и обычно состояла из прерывистых радиальных полос или расположенных в шахматном порядке пятен белого, серого или желтого цвета на темно-коричневом, темно-сером или оливковом фоне; белые радиальные пятна часто раздваивались по краю раковины, создавая многочисленные короткие радиальные параллельные линии вдоль устья раковины (рис. 4а–4в); иногда наружная поверхность раковины была почти однотонной: темно-серой, бурой или почти черной (рис. 4г) с единичными светлыми радиальными пятнышками. Многие определения были под вопросом или значились как *Lottia* sp. из-за сильно стертой поверхности раковины (рис. 4б, 4г). Однако генетический анализ показал, что все изученные особи относятся к одному виду. Это еще раз подтвердило, что окраска раковины у морских блюдечек – варибельный признак, зависящий от окраски субстрата, на котором питаются виды (Giesel, 1970; Hockey et al., 1987; Byers, 1989; Lindberg, Pearse, 1990). Раковина морских блюдечек просто устроена и чрезвычайно изменчива; ее высота может варьировать, например, при пересыхании места обитания морских блюдечек (Segal, 1956; Vermeij, 1973; Branch, 1975) или от турбулентности воды (Simpson, 1985). Морфология радулы зависит от диеты; у неродственных видов со сходным питанием она может приобретать черты значительного конвер-

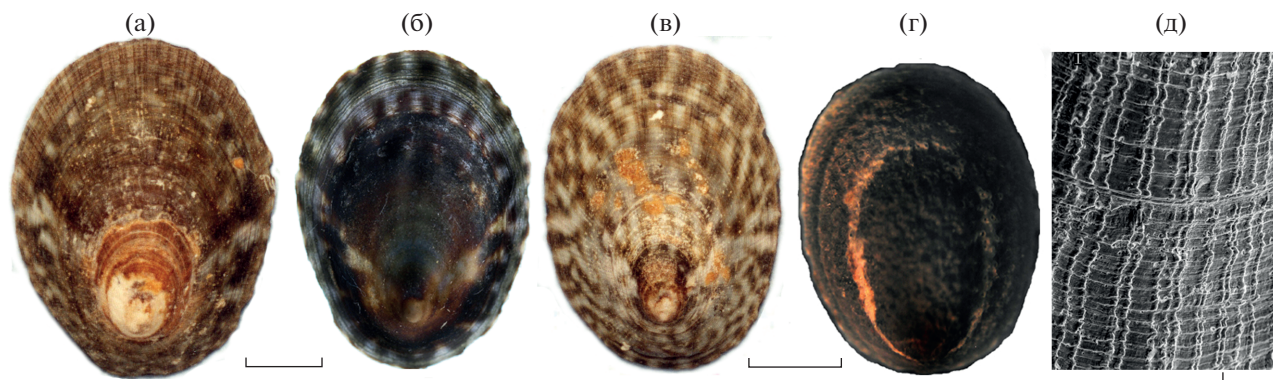


Рис. 4. Вариации окраски (а–г) и скульптура раковины (д) *Lottia cf. borealis*. Масштаб: а–г – 2 мм, д – 0.1 мм.

гентного сходства (Steneck, 1982; Lindberg, Vermeij, 1985; Sasaki, Okutani, 1993). Из-за различий в условиях обитания наблюдается значительная внутривидовая изменчивость морфологических признаков, что часто приводит к расхождению результатов морфологических и молекулярно-генетических исследований (Nakano, Ozawa, 2005).

При анализе гаплотипических сетей внутри клады *Lottia cf. borealis* по всем генетическим маркерам наблюдалась звездообразная структура с выраженным центральным гаплотипом, который имеет широкое распространение. Для остальных гаплогрупп характерно снижение уровня генетической дифференциации вдоль дальневосточного побережья России. Центральный гаплотип, вероятно, является предковым, а остальные гаплотипы дивергировали от него (Posada, Crandall, 2001). Низкий уровень генетического разнообразия и наличие широко распространенных доминантных гаплотипов согласуются с гипотезой о недавнем расширении ареала (Slatkin, Hudson, 1991; Rogers, Harpending, 1992) и высоком уровне миграции (Marko, 2004; Hoffman et al., 2011). Подобное отсутствие генетической структуры отмечено и у других морских организмов с непрямой развитием, например, у *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758 (см.: Toro et al., 2004) и у морского блюдечка *Nacella magellanica* (Gmelin, 1791) (см.: González-Wevar et al., 2012).

Генетический обмен внутри популяций и между ними у большинства морских бентосных видов происходит благодаря пелагической стадии личинки (Scheltema, 1971), а расстояние, на которое могут распространиться личинки, зависит от гидрографических условий (Avisé et al., 1986) и длительности личиночного развития (Nakano et al., 2010). Лецитотрофная личинка *Lottia cf. borealis* при температуре воды 20°C оседает на третьи сутки после оплодотворения (Колбин, Куликова, 2011). Столько же времени находятся в планктоне личинки *Lottia goshimai* Sasaki et Nakano, 2017 (Колбин, 2010: как *Lottia kogamogai* Sasaki & Оку-

tani, 1994) и *Nipponacmea moskalevi* Chernyshev et Chernova, 2002 (см.: Колбин, Куликова, 2002), а у *Lottia versicolor* (Moskalev in Golikov & Scarlato, 1967) личинки оседают на седьмые сутки (Колбин, Куликова, 2002). При этом ареал у всех трех видов значительно меньше, чем у вида *Lottia cf. borealis*, который распространен от зал. Петра Великого до Командорских островов. Следует отметить, что при низкой температуре время развития личинки может значительно увеличиваться (Wanninger et al., 1999; Wanninger et al., 2000; Kay, Emlet, 2002; Nakano, Sasaki, 2011), и в популяциях *Lottia cf. borealis* у о-ва Сахалин и Курильских островов время пребывания личинок в планктоне может быть более длительным.

По-видимому, *Lottia cf. borealis* относится к видам с низкой специфичностью к среде, населяя средний и нижний горизонты литорали открытых и полузакрытых побережий (Голиков, Кусакин, 1978; Чернышев, Чернова, 2005). Такие виды не имеют строгой генетической дифференциации, а протяженные участки, на которых отсутствуют подходящие условия среды, могут стать барьером для потока генов, даже несмотря на существование планктонной стадии, в течение которой личинки пателлогастропод способны преодолеть расстояние в 100–200 км (Nakano, Sasaki, 2011).

Таким образом, можно заключить, что вид *Lottia cf. borealis* широко распространен вдоль материкового побережья и островов Дальнего Востока России, а также встречается в Японии у о-ва Хоккайдо (Sasaki, 1999). На исследованном ареале для *Lottia cf. borealis* характерны относительно низкое генетическое разнообразие и отсутствие внутривидовой подразделенности, что может свидетельствовать о сравнительно недавней экспансии этого вида и высоком уровне миграции.

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 при поддержке гранта РФФИ (проект № 18-34-00304).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Голиков А.Н., Кусакин О.Г. Раковинные брюхоногие моллюски литорали морей СССР // Определители по фауне СССР. Л.: Наука. 1978. Т. 116. 292 с.
- Гульбин В.В. Фауна брюхоногих переднежаберных моллюсков залива Петра Великого Японского моря и ее биогеографический состав // Биол. моря. 2004. Т. 30. № 1. С. 20–29.
- Колбин К.Г. Размножение и развитие некоторых массовых видов переднежаберных брюхоногих моллюсков залива Петра Великого Японского моря: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток. 2010. 22 с.
- Колбин К.Г., Куликова В.А. Размножение и развитие *Lottia versicolor* и *Nipponacmea moskalevi* (Gastropoda, Lottiidae) // V Регион. конф. по актуальным проблемам экологии, морской биологии и биотехнологии: Материалы конф. студентов, аспирантов и молодых ученых ДВГУ (академия экологии, морской биологии и биотехнологии), ИБМ ДВО РАН. Владивосток, 21–24 ноября 2002. Владивосток: Изд-во ДВГУ. 2002. С. 61–62.
- Колбин К.Г., Куликова В.А. Размножение и личиночное развитие морского блюдечка *Lottia persona* (Rathke, 1833) (Gastropoda: Lottiidae) // Биол. моря. 2011. Т. 37. № 3. С. 229–232.
- Москалев Л.И. Брюхоногие моллюски рода *Collisella* (Prosobranchia, Asmaeidae) окраинных азиатских морей Тихого океана // Тр. ИО АН СССР. 1970. Т. 88. С. 174–212.
- Чернышев А.В. О типовом экземпляре *Acmaea persona* Rathke, 1833 (Gastropoda) // Ruthenica (Рус. малакол. журн.). 2004. Т. 14. № 1. С. 5–8.
- Чернышев А.В., Чернова Т.В. Систематическое положение *Lottia angusta* (Moskalev in Golikov et Scarlato, 1967) (Gastropoda, Lottiidae) // Ruthenica (Рус. малакол. журн.). 2004. Т. 14. № 1. С. 1–4.
- Чернышев А.В., Чернова Т.В. Пателлогастроподы (Patellogastropoda) дальневосточных морей России // Бюл. Дальневост. малакол. о-ва. 2005. Вып. 9. С. 7–26.
- Чернышев А.В., Чернова Т.В. Ключи для определения пателлогастропод (Patellogastropoda) дальневосточных морей России // Бюл. Дальневост. малакол. о-ва. 2007. Вып. 11. С. 65–74.
- Abbott D.P., Epel D., Phillips J.H., Abbot I.A. Undergraduate research and the biology of *Acmaea* // Veliger. 1968. V. 11 (suppl.). P. 1–5.
- Avise J.C., Helfman G.S., Saunders N.C., Hales L.S. Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: population genetic consequences of an unusual life history pattern // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 12. P. 4350–4354.
- Branch G.M. Ecology of *Patella* species from the Cape Peninsula, South Africa. IV. Desiccation // Mar. Biol. 1975. V. 32. P. 179–188.
- Byers B.A. Habitat-choice polymorphism associated with cryptic shell-color polymorphism in the limpet *Lottia digitalis* // Veliger. 1989. V. 32. P. 394–402.
- Castelin M., Van Steenkiste N., Pante E et al. A new integrative framework for large-scale assessments of biodiversity and community dynamics, using littoral gastropods and crabs of British Columbia, Canada // Mol. Ecol. Resour. 2016. V. 16. № 6. P. 1322–1339.
- Corse E., Rampal J., Cuoc C. et al. Phylogenetic analysis of *Thecosomata* Blainville, 1824 (Holoplanktonic Opisthobranchia) using morphological and molecular data // PLoS One. 2013. V. 8. № 4. Art. ID e59439. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059439>
- Crummett L.T., Eernisse D.J. Genetic evidence for the cryptic species pair, *Lottia digitalis* and *Lottia austrodigitalis* and microhabitat partitioning in sympatry // Mar. Biol. 2007. V. 152. P. 1–13.
- Espoz C., Castilla J.C. Escape responses of four Chilean intertidal limpets to seastars // Mar. Biol. 2000. V. 137. № 5. P. 887–892.
- Evans N., Paulay G. DNA Barcoding Methods for Invertebrates // DNA Barcodes: Methods and Protocols // Methods in molecular biology. V. 858. Totowa, N.J.: Humana Press. 2012. P. 44–77.
- Giesel J.T. On the maintenance of a shell pattern and behavior polymorphism in *Acmaea digitalis*, a limpet // Evolution. 1970. V. 24. P. 98–119.
- Goldstien S.J., Gemmell N.J., Schiel D.R. Molecular phylogenetics and biogeography of the nacellid limpets of New Zealand (Mollusca: Patellogastropoda) // Mol. Phylogenet. Evol. 2006. V. 38. P. 261–265.
- González-Wevar C.A., Hüne M., Cañete J.I. et al. Towards a model of postglacial biogeography in shallow marine species along the Patagonian Province: lessons from the limpet *Nacella magellanica* (Gmelin, 1791) // BMC Evol. Biol. 2012. V. 12. Art. ID 139. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-139>
- González-Wevar C.A., Hüne M., Rosenfeld S. et al. Systematic revision of *Nacella* (Patellogastropoda: Nacellidae) based on a complete phylogeny of the genus, with the description of a new species from the southern tip of South America // Zool. J. Linn. Soc. 2019. V. 186. P. 303–336.
- Harasewych M.G., McArthur A.G. A molecular phylogeny of the Patellogastropoda (Mollusca: Gastropoda) // Mar. Biol. 2000. V. 137. P. 183–194.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. Biological identifications through DNA barcodes // Proc. R. Soc. London, Ser. B. 2003. V. 270. P. 313–321.
- Hockey P.A.R., Bosman A.L., Ryan P.G. The maintenance of polymorphism and cryptic mimesis in the limpet *Scurria variabilis* by two species of Cinclodes (Aves: Furnariinae) in central Chile // Veliger. 1987. V. 30. P. 5–10.
- Hodgson A.N., Ridgway S., Branch G.M., Hawkins S.J. Spermatozoan morphology of 19 species of prosobranch limpets (Patellogastropoda) with a discussion of patel-

- lid relationships // *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B*. 1996. V. 351. P. 339–347.
- Hoffman J.I., Clarke A., Linse K., Peck L.S. Effects of brooding and broadcasting reproductive modes on the population genetic structure of two Antarctic gastropod molluscs // *Mar. Biol.* 2011. V. 158. № 2. P. 287–296.
- Johnson S.B., Warén N.A., Vrijenhoek R.C. DNA barcoding of *Lepetodrilus* limpets reveals cryptic species // *J. Shellfish Res.* 2008. V. 27. P. 43–51.
- Kappner I., Bieler R. Phylogeny of venus clams (Bivalvia: Venerinae) as inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2006. V. 40. Iss. 2. P. 317–331.
- Kay M.C., Emler R.B. Laboratory spawning, larval development, and metamorphosis of the limpets *Lottia digitalis* and *Lottia asmi* (Patellogastropoda, Lottiidae) // *Invertebr. Biol.* 2002. V. 121. P. 11–24.
- Kelly R.P., Palumbi S.R. Genetic structure among 50 species of the northeastern Pacific rocky intertidal community // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 1, art. ID e8594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008594>
- Koufopanou V., Reid D.G., Ridgway S.A., Thomas R.H. A molecular phylogeny of the patellid limpets (Gastropoda: Patellidae) and its implications for the origins of their antitropical distribution // *Mol. Phylogenet. Evol.* 1999. V. 11. P. 138–156.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33. P. 1870–1874.
- Layton K.K.S., Martel A.L., Hebert P.D.N. Patterns of DNA barcode variation in Canadian marine molluscs // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 4, art. ID e95003. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095003>
- Leigh J., Bryant D. POPART: Full-feature software for haplotype network construction // *Methods Ecol. Evol.* 2015. V. 6. № 9. P. 1110–1116.
- Lindberg D.R. Taxonomic notes on members of the genus *Collisella* from the North Pacific Ocean including a description of a new species from Alaska (Gastropoda: Acmaeidae) // *Wasmann J. Biol.* 1982. V. 40. Nos. 1–2. P. 48–58.
- Lindberg D.R. Name changes in the “Acmaeidae” // *Veliger*. 1986. V. 29. № 2. P. 142–148.
- Lindberg D.R. Systematics of the Scurriini (new tribe) of the northern Pacific Ocean (Patellogastropoda: Lottiidae) // *Veliger*. 1988. V. 30. № 4. P. 387–394.
- Lindberg D.R. Patellogastropoda, Neritimorpha and Cocculinoidea: The low-diversity gastropods clades // *Phylogeny and evolution of the Mollusca*. Berkeley, Calif.: Univ. of California Press. 2008. P. 271–296.
- Lindberg D.R., Vermeij G.J. *Patelloida chamorrorum* spec. nov.: a new member of the Tethyan *Patelloida profunda* group (Gastropoda: Acmaeidae) // *Veliger*. 1985. V. 27. P. 411–417.
- Lindberg D.R., Pearse J.S. Experimental manipulation of shell color and morphology of the limpets *Lottia asmi* (Middendorff) and *Lottia digitalis* (Rathke) (Mollusca: Patellogastropoda) // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1990. V. 140. P. 173–185.
- Marko P.B. ‘What’s larvae got to do with it?’ Disparate patterns of post-glacial population structure in two benthic marine gastropods with identical dispersal potential // *Mol. Ecol.* 2004. V. 13. P. 597–611.
- Miller M.A., Pfeiffer W., Schwartz T. Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees, in 2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE). New Orleans, LA, USA. 2010. P. 1–8.
- Nakano T., Ozawa T. Phylogeny and historical biogeography of limpets or the order Patellogastropoda based on mitochondrial DNA sequences // *J. Molluscan Stud.* 2004. V. 70. P. 31–41.
- Nakano T., Ozawa T. Systematic revision of *Patelloida pygmaea* (Dunker, 1860) (Gastropoda: Lottiidae), with a description of a new species // *J. Molluscan Stud.* 2005. V. 71. P. 357–370.
- Nakano T., Ozawa T. Worldwide phylogeography of limpets of the order Patellogastropoda: molecular, morphological and palaeontological evidence // *J. Molluscan Stud.* 2007. V. 73. P. 79–99.
- Nakano T., Spencer H.G. Simultaneous polyphenism and cryptic species in an intertidal limpet from New Zealand // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2007. V. 45. P. 470–479.
- Nakano T., Marshall B.A., Kennedy M., Spencer H.G. The phylogeny and taxonomy of New Zealand *Notoacmea* and *Patelloida* species (Mollusca: Patellogastropoda: Lottiidae) inferred from DNA sequences // *Molluscan Res.* 2009. V. 29. P. 33–59.
- Nakano T., Sasaki T., Kase T. Color polymorphism and historical biogeography in the Japanese patellogastropod limpet *Cellana nigrolineata* (Reeve) (Patellogastropoda: Nacellidae) // *Zool. Sci.* 2010. V. 27. P. 811–820.
- Nakano T., Sasaki T. Recent advances in molecular phylogeny, systematics and evolution of patellogastropod limpets // *J. Molluscan Stud.* 2011. V. 77. P. 203–217.
- Nakayama R., Sasaki T., Nakano T. Molecular analysis reveals a new cryptic species in a limpet *Lottia kogamogai* (Patellogastropoda: Lottiidae) from Japan // *Zootaxa*. 2017. V. 4277. № 2. P. 237–251.
- Nieukerken E.J.V., Mutanen M., Doorenweerd C. DNA barcoding resolves species complexes in *Stigmella salicis* and *S. aurella* species groups and shows additional cryptic speciation in *S. salicis* (Lepidoptera: Nepticulidae) // *Entomologisk Tidskrift*. 2012. V. 132. P. 235–255.
- Nylander J.A.A. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Uppsala, Sweden: Uppsala Univ., Evolutionary Biology Centre. 2004.
- Posada D., Crandall K.A. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks // *Trends Ecol. Evol.* 2001. V. 16. P. 37–45.
- Rogers A., Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences // *Mol. Biol. Evol.* 1992. V. 9. № 3. P. 552–569.
- Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P. et al. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space // *Syst. Biol.* 2012. V. 61. P. 539–542.
- Sasaki T. The present state and problems of the taxonomy of Japanese patellogastropod limpets. Part II: Lottiidae // *Newsl. Malacological Soc. Jpn.* 1999. V. 29. P. 37–46.
- Sasaki T., Okutani T. Anatomy and systematic position of *Yayoiacmea*, a new genus for Japanese tiny limpet “Col-

- lisella*” *oyamai* Habe, 1955 (Gastropoda: Lottiidae) // Venus. 1993. V. 52. P. 193–209.
- Sasaki T., Okutani T. An analysis on “*Collisella heroldi*” complex (Gastropoda: Lottiidae), with description of three new species // Venus. 1994. V. 53. № 4. P. 251–285.
- Scheltema R.S. Larval dispersal as a means of genetic exchange between geographically separated populations of shallow-water benthic marine gastropods // Biol. Bul. 1971. V. 140. № 2. P. 284–322.
- Segal E. Adaptive differences in water-holding capacity in an intertidal gastropod // Ecology. 1956. V. 37. P. 174–178.
- Sharina S.N., Chernyshev A.V., Zaslavskaya N.I. Genetic diversity and phylogeny of limpets of the genus *Nipponacmea* (Patellogastropoda: Lottiidae) based on mitochondrial DNA sequences // Mitochondrial DNA, Part A. 2016. V. 28. № 5. P. 703–710.
- Simison W.B., Lindberg D.R. Morphological and molecular resolution of a putative cryptic species complex: a case study of *Notoacmea fascicularis* (Menke, 1851) (Gastropoda: Patellogastropoda) // J. Molluscan Stud. 1999. V. 65. P. 99–109.
- Simison W.B., Lindberg D.R. On the identity of *Lottia strigatella* (Carpenter, 1864) (Patellogastropoda: Lottiidae) // Veliger. 2003. V. 46. P. 1–19.
- Simpson R.D. Relationship between allometric growth, with respect to shell height and habitats for two patellid limpets, *Nacella (Patinigera) macquariensis* Finlay, 1927 and *Cellana tramoserica* (Holten, 1802) // Veliger. 1985. V. 28. P. 18–27.
- Slatkin M., Hudson R.R. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations // Genetics. 1991. V. 129. P. 555–562.
- Steneck R.S. A limpet-coraline alga association: adaptations and defenses between a selective herbivore and its prey // Ecology. 1982. V. 63. P. 507–522.
- Toro J.E., Ojeda J.A., Vergara A.M. The genetic structure of *Mytilus chilensis* (Hupé 1854) populations along the Chilean coast based on RAPDs analysis // Aquacult. Res. 2004. V. 35. P. 1466–1471.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties, and weight matrix choice // Nucleic Acids Res. 1994. V. 22. № 22. P. 4673–4680.
- Vawter L., Brown W.M. Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock // Science. 1986. V. 234. P. 194–196.
- Vermeij G.J. Morphological patterns in high-intertidal gastropods: Adaptive strategies and their limitations // Mar. Biol. 1973. V. 20. P. 319–346.
- Wanninger A., Ruthensteiner B., Lobenwein S. et al. Development of the musculature in the limpet *Patella* (Mollusca, Patellogastropoda) // Dev. Genes Evol. 1999. V. 209. P. 226–238.
- Wanninger A., Ruthensteiner B., Haszprunar G. Torsion in *Patella caerulea* (Mollusca, Patellogastropoda): ontogenetic process, timing, and mechanisms // Invertebr. Biol. 2000. V. 119. P. 177–187.
- Uribe J.E., Irisarri I., Templado J., Zardoya R. New patello-gastropod mitogenomes help counteracting long-branch attraction in the deep phylogeny of gastropod mollusks // Mol. Phylogenet. Evol. 2019. V. 133. P. 12–23.
- Yu S.-S., Wang J., Wang Q.-L. et al. DNA barcoding and phylogeographic analysis of *Nipponacmea* limpets (Gastropoda: Lottiidae) in China // J. Molluscan Stud. 2014. V. 80. P. 420–429.

A Genetic Analysis of the Limpet *Lottia* cf. *borealis* (Patellogastropoda: Lottiidae) from the Far Eastern Seas of Russia

S. N. Sharina^a, V. V. Malyar^a, and A. V. Chernyshev^a

^aA.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

The limpet *Lottia* cf. *borealis*, a widely distributed gastropod species in the Far Eastern Seas of Russia, has been subjected to genetic analysis. Three genetic markers (*COI*, *16S*, and *12S*) have shown no evidence of a distinct genetic structure of this species within the studied part of its range (the southern coast of Primorsky Krai and coasts of Sakhalin Island and the southern Kuril Islands). A phylogenetic analysis has revealed that *Lottia* cf. *borealis* is a sister taxon to *L. paradigitalis* (Fritchman, 1960).

Keywords: Sea of Japan, Sea of Okhotsk, population, *16S*, *12S*, *COI*

УДК 581.1:582.26

**УЛЬТРАСТРУКТУРА И АВТОТРОФНАЯ ФУНКЦИЯ КЛЕТОК
РАФИДОФИТОВОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *HETEROSIGMA AKASHIWO*
(Y. HADA) Y. HADA EX Y. HARA AND M. SHIHARA, 1987
В ЗАГРЯЗНЕННОЙ МЕДЬЮ СРЕДЕ**

© 2021 г. Ж. В. Маркина*

Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского (ННЦМБ) ДВО РАН,
Владивосток 690041, Россия

*e-mail: zhannav@mail.ru

Поступила в редакцию 14.11.2019 г.

После доработки 19.03.2020 г.

Принята к публикации 20.01.2021 г.

Изучено действие меди в концентрациях 10, 25 и 50 мкг/л на рост популяции, физиологическое состояние и ультраструктуру микроводоросли *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). Показано, что медь в большей степени влияет на мембранный потенциал митохондрий, чем на флуоресценцию хлорофилла *a*. Содержание нейтральных липидов в течение опыта в экспериментальных клетках было ниже, чем в контроле. Отмечено, что морфология органелл водоросли не изменялась ни при одной из выбранных концентраций меди, однако при содержании меди 25 и 50 мкг/л в клетках водоросли увеличивалось количество вакуолей.

Ключевые слова: *Heterosigma akashiwo*, загрязнение, медь, митохондрии, флуоресценция хлорофилла *a*, нейтральные липиды, ультраструктура

DOI: 10.31857/S0134347521030074

В последние десятилетия в разных акваториях Мирового океана все чаще отмечают случаи токсичного “цветения”, вызываемого рафидофитовой водорослью *Heterosigma akashiwo* (Heisler et al., 2008; Kempton et al., 2008; Shikata et al., 2008; Dursun et al., 2016). Накапливаясь, токсины приводят к массовой гибели рыб и беспозвоночных (Yu et al., 2010; Mohamed, Al-Shehri, 2012). В связи с этим актуальны исследования, направленные на поиск факторов, которые вызывают массовое размножение данного вида водорослей. На шести клонах *H. akashiwo* разного географического происхождения показано, что соленость и температура – это абиотические факторы, детерминирующие “цветение” водорослей (Martínez et al., 2010). Однако чаще это явление объясняют возрастающим загрязнением окружающей среды. Так, увеличение концентрации нитратов или соединений аммония вызывает “цветение” продуцирующей токсины диатомеи *Pseudo-nitzschia pungens*, фосфатов – синезеленых водорослей и динофлагеллят, а кремния – диатомовых водорослей (Heisler et al., 2008). Для *H. akashiwo* известно, что ее “цветение” обусловлено одновременным увеличением содержания фосфатов и нитратов (Shikata et al., 2008; Dursun et al., 2016).

Среди огромного количества загрязняющих веществ одним из самых изучаемых на протяжении долгого времени остается медь. Это связано с высоким объемом поступления меди в среду: до 90 тыс. т в год (Miazek et al., 2015). В морях России максимальные концентрации меди обнаружены в районах морских портов в Японском море (99 мкг/л), а также в Охотском и Черном морях (50 мкг/л) (Качество..., 2017).

Действие меди на микроводоросли подробно описано в нескольких обзорах (Yruela, 2005; Nagajyoti et al., 2010; Hossain et al., 2012; Miazek et al., 2015). Оценена динамика численности популяции водорослей под воздействием Cu, показано влияние этого металла на фотосинтетический аппарат – основной поставщик энергии для растения (Toncheva-Panova et al., 2006; Perales-Vela et al., 2007; Титов и др., 2011; Sibi et al., 2014; Hamed et al., 2017; Wang et al., 2017). Изменению состояния митохондрий, вызванного присутствием этого элемента, уделено гораздо меньше внимания (Cid et al., 1996). Интенсивное производство микроводорослями нейтральных липидов – одно из последствий стресса, причиной которого является действие тяжелых металлов. Производство липидов и включение их в мета-

болические пути тесно связаны с фотосинтезом, дыханием и другими физиологическими процессами (Соловченко, 2012; Рус et al., 2017).

В практике исследования влияния факторов среды на одноклеточные водоросли все чаще используется проточная цитометрия. Этот метод позволяет определить численность клеток и их размерную структуру, а также оценить физиологическое состояние микроводорослей (Нука et al., 2013). Работы, описывающие ультраструктурные изменения водорослей при воздействии меди, малочисленны, что можно объяснить трудоемкостью данного метода (Chen et al., 2016).

Влияние меди на живые организмы оценивают, как правило, в летальных и сублетальных концентрациях (от 100 мкг/л), что позволяет выявить механизмы действия металла. Однако полученные данные сложно интерпретировать для природных условий. В связи с этим в настоящей работе изучено действие меди в концентрациях 10, 25 и 50 мкг/л на динамику численности, флуоресценцию хлорофилла *a*, мембранный потенциал митохондрий, содержание нейтральных липидов и ультраструктуру микроводоросли *H. akashiwo* (Raphidophyceae).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектом исследования служила культура одноклеточной водоросли *Heterosigma akashiwo* MBRU_HAK-SR11 (Y. Nada) Y. Nada ex Y. Naga and M. Chihara 1987 (Raphidophyceae), которая была выделена из воды, отобранной в б. Золотой Рог (Японское море). Водоросль выращивали на среде *f*, приготовленной на основе фильтрованной и стерилизованной морской воды соленостью 32‰, в 250-миллилитровых колбах Эрленмейера с объемом культуральной среды 100 мл при температуре 18°C, интенсивности освещения 70 мкмоль/м²/с в области видимого света и при свето-темновом периоде 14 ч свет : 10 ч темнота (Орлова и др., 2011). В качестве инокулята использовали культуру на экспоненциальной стадии роста. Начальная концентрация клеток микроводоросли во всех опытах составляла 2×10^4 кл/мл; продолжительность экспериментов – 7 сут. Пробы для проточно-цитометрического анализа отбирали через 3 и 7 сут опыта, для ультраструктурного анализа – через 7 сут. Медь добавляли в виде $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; концентрации (10, 25 и 50 мкг/л) указаны в пересчете на ионы меди.

Показатели измеряли на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Для анализа записано 10 тыс. событий (регистрируемых в пробе частиц) в течение каждого измерения. Выбор клеток водорослей из общего числа событий, регистрируемых цитометром, проводили по флуоресценции хлорофилла *a* (Нука et al., 2013).

Интенсивность флуоресценции хлорофилла *a* регистрировали на длине волны 690 нм, длина волны возбуждения составляла 488 нм (Нука et al., 2013). Для определения мембранного потенциала митохондрий использовали флуоресцентный краситель DiOC₆(3) (318426-250MG, Sigma-Aldrich) в концентрации 50 нМ. Клетки инкубировали в присутствии красителя в течение 30 мин; длина волны возбуждения составляла 488 нм, испускания – 525 нм (Зурочка и др., 2014). Содержание нейтральных липидов определяли по флуоресценции флуорохрома Nile Red (N3013-100MG, Sigma Aldrich) в концентрации 1 мкг/мл; окрашивание проводили в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте; длина волны возбуждения составляла 488 нм, испускания – 580 нм (Alemań-Nava et al., 2016).

Для электронно-микроскопического анализа клетки *H. akashiwo* фиксировали в течение 2 ч в 2.5% глутаральдегиде (G5885-10XML, Sigma-Aldrich), приготовленном на какодилатном буфере с pH 7.4 (12300-25, EMS), с дофиксацией 1% четырехокси-сью осмия (19150, EMS) на этом же буфере в течение 1 ч. Затем материал обезживали в серии спиртов возрастающей концентрации и ацетона, после этого заливали в смесь смол Epon-Araldite (13940, EMS) по стандартной методике (Luft, 1961). Срезы толщиной 70 нм изготавливали на ультрамикротоме Ultracut R LEICA (Австрия), контрастировали 2% раствором уранилацетата и цитратом свинца (Reynolds, 1963). Срезы исследовали на трансмиссионном электронном микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss, Германия).

Эксперименты проведены в трех повторностях, данные выражены в процентах к контролю (контроль – показатели, полученные для культуры водоросли без добавления меди). Для оценки достоверности полученных различий рассчитывали U-критерий Манна–Уитни. Статистическая обработка выполнена с помощью программы Excel. На графиках представлены средние значения и стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В течение опыта численность клеток *Heterosigma akashiwo* при концентрации меди 10 мкг/л не отличалась от таковой в контроле. При содержании меди 25 и 50 мкг/л наблюдалось угнетение роста микроводоросли, особенно сильное на седьмые сутки опыта (рис. 1а). Флуоресценция хлорофилла *a* не отличалась от таковой в контроле на третьи сутки опыта, но снижалась на седьмые сутки. Изменения не носили дозозависимого эффекта (рис. 1б). Мембранный потенциал митохондрий на третьи сутки опыта был ниже, чем в контроле, и не восстановился к завершению эксперимента (рис. 1в). Содержание нейтральных

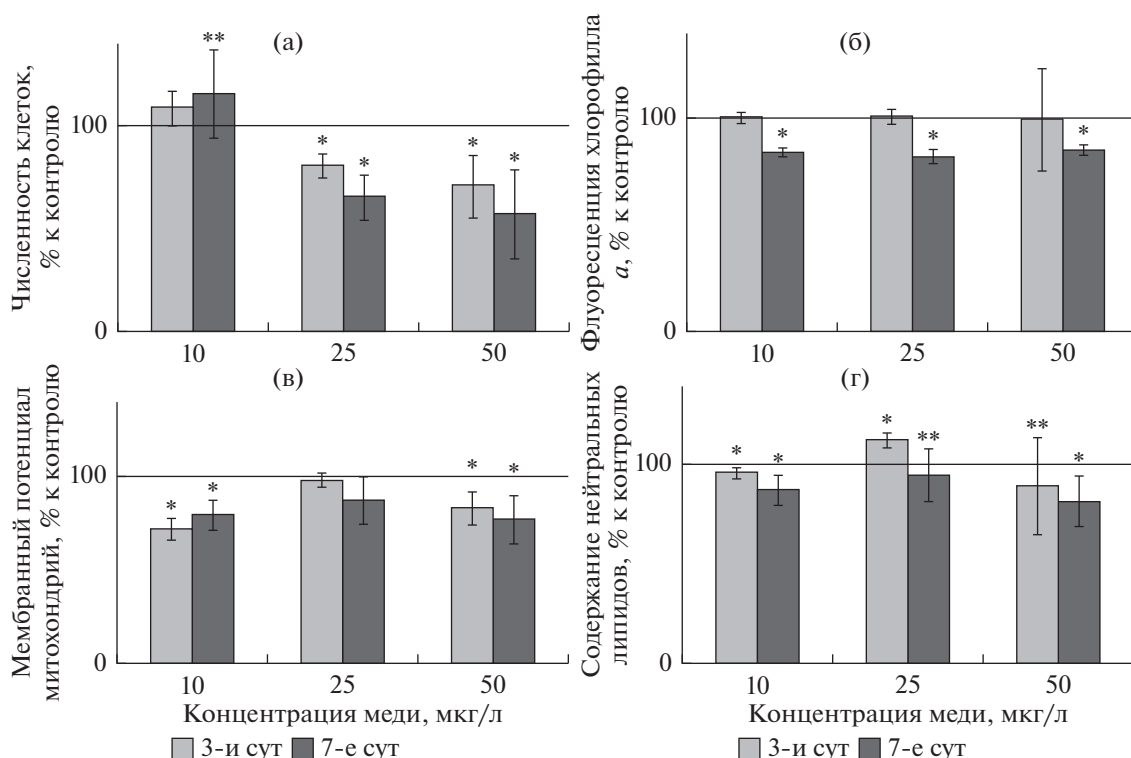


Рис. 1. Рост популяции и физиологическое состояние микроводоросли *Heterosigma akashiwo* при воздействии меди: а – численность клеток; б – флуоресценция хлорофилла *a*; в – мембранный потенциал митохондрий; г – содержание мембранных липидов. *Различия достоверны при $p \leq 0.01$; **различия достоверны при $p \leq 0.05$.

липидов при всех концентрациях меди на седьмые сутки было ниже контрольного (рис. 1г).

В контроле клетки *H. akashiwo* имели вытянутую овальную форму (размер около 10–14 мкм); отмечено множество хлоропластов золотистого цвета, которые располагались пристеночно. Хлоропласты содержали многочисленные ламеллы, каждая из которых состояла из двух тилакоидов. В строме хлоропластов находились пластоглобулы. В центре клетки располагалось округлое ядро диаметром около 4 мкм, рядом находились аппарат Гольджи и митохондрии. Митохондрии клеток *H. akashiwo* имели вытянутую овальную форму; их размер варьировал от 0.5 до 1 мкм (рис. 2а).

При воздействии меди в концентрации 10 мкг/л на клетки *H. akashiwo* изменений на ультраструктурном уровне не выявлено (рис. 2б). При содержании меди в концентрациях 25 и 50 мкг/л также не отмечено значительных изменений фотосинтетического аппарата, митохондрий и других органелл, однако в клетке увеличилось число вакуолей (рис. 2в, 2г).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что рост популяции микроводоросли *Heterosigma akashiwo* ингибировался уже при концентрации меди 25 мкг/л.

Известно, что рост зелёной водоросли *Scenedesmus incrassatulus* замедлялся через 6 сут экспозиции при содержании металла 40 и 80 мкг/л (Perales-Vela et al., 2007). Такая же реакция на концентрацию меди 50–100 мкг/л выявлена у диатомовой водоросли *Phaeodactylum tricoratum* (Cid et al., 1996). Снижение численности клеток связано с тем, что медь нарушает многие внутриклеточные процессы, тем самым влияя на рост фотосинтезирующих организмов. В стрессовых условиях организмы используют энергию, предназначенную для роста, на процессы, необходимые для контроля и поддержания клеточного гомеостаза, т.е. для выживания популяции (Perales-Vela et al., 2007).

Основное повреждающее действие меди как результат ее участия в реакциях Фентона и Хабер-Вейса обусловлено продуцированием активных форм кислорода (Hossain et al., 2012; Chen et al., 2016). Известно, что большая часть активных форм кислорода образуется в хлоропластах и митохондриях (Schmitt et al., 2014), поэтому фотосинтетический аппарат и митохондрии наиболее уязвимы к действию факторов среды.

Флуоресценция хлорофилла *a* снижается при нарушении работы фотосинтетического аппарата в результате ингибирования потока электронов, выцветания хлорофилла *a* или уменьшения его

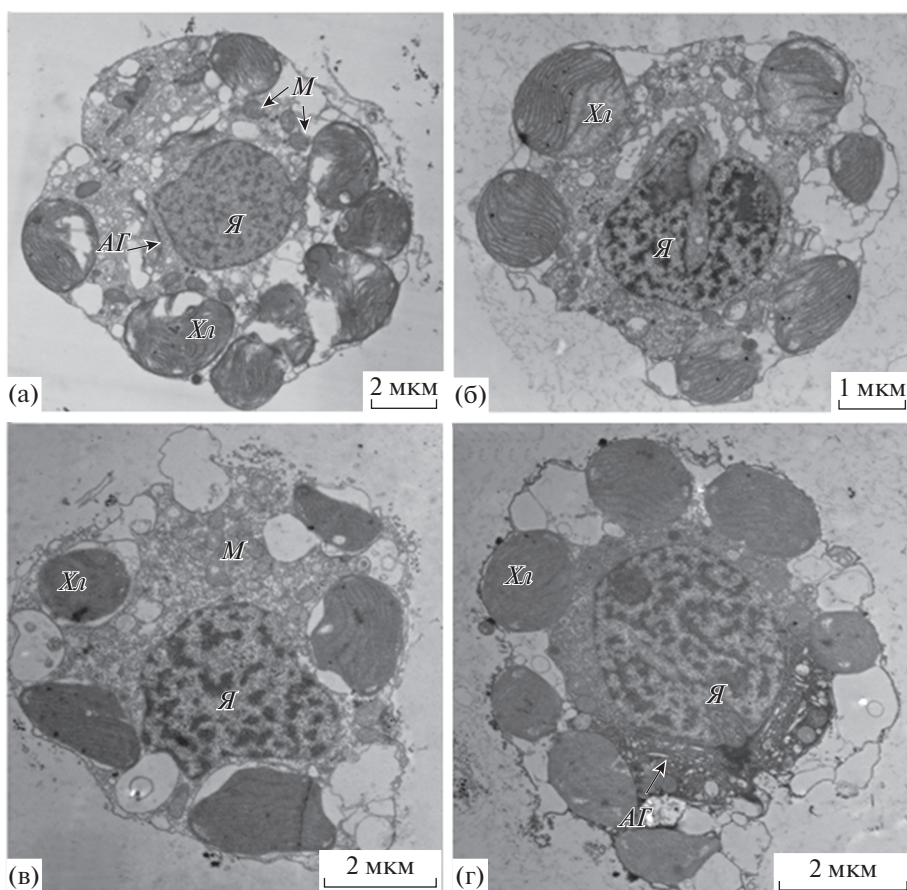


Рис. 2. Ультраструктура клеток *Heterosigma akashiwo* в контроле и при воздействии меди: а – контроль; концентрация меди: б – 10 мкг/л, в – 25 мкг/л, г – 50 мкг/л. Условные обозначения: Я – ядро, М – митохондрии (указаны стрелками), Хл – хлоропласты, АГ – аппарат Гольджи.

концентрации (Cid et al., 1997; Chen et al., 2016; Named et al., 2017; Wang et al., 2017). В нашем эксперименте снижение флуоресценции хлорофилла *a* отмечено на седьмые сутки опыта. Воздействие тяжелых металлов на хлорофилл *a* может быть прямым при непосредственном его разрушении и опосредованным, как следствие нарушения реакций его синтеза и ингибирования ферментов, участвующих в процессе синтеза (Perales-Vela et al., 2007). Медь играет важную роль в электронном транспорте в фотосистемах, и ее избыток приводит к изменению потока электронов в электрон-транспортной цепи. Способность меди заменять магний в молекуле хлорофилла *a* делает пигмент непригодным для фотосинтеза (Miazek et al., 2015; Chen et al., 2016). Сбрасываемая энергия от таких поврежденных хлорофиллов может передаваться молекулярному кислороду, что приводит к появлению синглетного кислорода, вызывающего окислительное повреждение (Nagajyoti et al., 2010; Wang et al., 2017), что также является одной из причин снижения флуоресценции хлорофилла *a* и изменения ряда физиологических показателей.

Размер, численность и субклеточное распределение митохондрий могут изменяться в зависимости от физиологических потребностей клеток и факторов среды. У исследованной водоросли на протяжении эксперимента наблюдалось снижение мембранного потенциала, что свидетельствует о деполяризации мембран (Cid et al., 1996). Такое же явление зарегистрировано через трое суток опыта у зеленой водоросли *Pseudokirchneriella subcapitata* при концентрации меди 80 мкг/л (Machado, Soares, 2014) и у диатомеи *Phaeodactylum tricorutum* при содержании меди 100 мкг/л (Cid et al., 1996). При нарушении работы хлоропластов усиливается роль митохондрий в метаболических процессах. Вероятно, это послужило причиной снижения мембранного потенциала митохондрий у *H. akashiwo*. Увеличение нагрузки на митохондрии в условиях загрязнения связано с активацией клеточных процессов, направленных на детоксикацию металла и поддержание клеточной целостности в токсических условиях (Cid et al., 1996; Perales-Vela et al., 2007). Отмечено, что на клеточные мембраны митохондрий медь влияет сильнее, чем другие металлы, присутствующие

даже в больших концентрациях (Machado, Soares, 2014).

В стрессовых условиях любой природы в микроводорослях могут накапливаться нейтральные липиды. При концентрациях меди 10–28 мкг/л у видов рода *Chlorella* наблюдали увеличение содержания липидов, однако рост популяций оставался таким же, как и в среде без токсиканта (Sibi et al., 2014; Yang et al., 2015). У *H. akashiwo* при внесении меди в среду, напротив, отмечено уменьшение содержания липидов. Возможно, это связано с видовыми особенностями клеток, так как у представителей рода *Chlorella* даже при благоприятных условиях более высокое содержание липидов, чем у других видов (Yang et al., 2015). Кроме того, снижение содержания нейтральных липидов может быть обусловлено их использованием для компенсации энергозатрат клетки в токсических условиях. На примере другого тяжелого металла кадмия показано, что при повышении его содержания в среде у микроводорослей снижалось количество нейтральных липидов и разрушались липидные тельца (El-Naggar, Sheikh, 2014; Miazek et al., 2015).

Ультраструктура клеток *H. akashiwo* не изменялась по сравнению с таковой в контроле при интоксикации медью в концентрации 10 мкг/л; при более высоком содержании металла отмечено увеличение количества вакуолей в клетке. На увеличение количества и размера вакуолей в присутствии Cu в среде указывали и ранее (Adams et al., 2016; Chen et al., 2016), как и на изменение хлоропластов, накопление крахмальных гранул и утолщение клеточной оболочки (El-Naggar, Sheikh, 2014). Известно, что в условиях стресса вакуоли могут накапливать некоторые соединения, обладающие сильным антиоксидантным действием, и участвовать в выведении тяжелых металлов из клетки (Андреев, 2012). Увеличение числа вакуолей у *H. akashiwo*, вероятно, также является одним из защитных механизмов.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод, что медь в концентрациях 10–50 мкг/л не вызывает повреждений клетки, однако приводит к нарушению её функционирования. По чувствительности к меди изученные показатели можно расположить в следующем порядке: рост популяции > мембранный потенциал митохондрий > содержание нейтральных липидов > флуоресценция хлорофилла *a* > ультраструктура.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит Мирославу Алексеевну Сабуцкую (ННЦМБ ДВО РАН) за помощь при обсуждении результатов ультраструктурного анализа. Культура микроводоросли *Heterosigma akashiwo* MBRU_HAK-SR11 предоставлена ресурсным центром “Морской биобанк” ННЦМБ ДВО РАН (<http://marbank.dvo.ru>). Проточно-цитометрический анализ выполнен в ННЦМБ ДВО РАН; автор искренне благодарит сотрудников Лаборатории клеточных технологий за помощь в работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреев И.М. Роль вакуоли в редокс-гомеостазе растительных клеток // Физиол. растений. 2012. Т. 59. С. 660–667.
- Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в медицине и биологии: 2-е изд. дополненное и расширенное. Екатеринбург: РИО УрО РАН. 2014. 576 с.
- Качество морских вод по гидрохимическим показателям. Ежегодник 2016. М.: Наука. 2017. 190 с.
- Орлова Т.Ю., Айздайчер Н.А., Стоник И.В. Лабораторное культивирование морских микроводорослей, включая продуцентов фитотоксинов: научно-методическое пособие. Владивосток: Дальнаука. 2011. 89 с.
- Соловченко А.Е. Физиологическая роль накопления нейтральных липидов эукариотическими микроводорослями при стрессах // Физиол. растений. 2012. Т. 59. С. 192–202.
- Титов А.Ф., Таланова В.В., Казнина Н.М. Физиологические основы устойчивости растений к тяжелым металлам: учеб. пособие. Институт биологии КарНЦ РАН. Петрозаводск: Карельский науч. центр РАН. 2011. 77 с.
- Adams M.S., Dillon C.T., Vogt S. et al. Copper uptake, intracellular localization and speciation in marine microalgae measured by synchrotron radiation X-ray fluorescence and absorption microspectroscopy // Environ. Sci. Technol. 2016. V. 50. P. 8827–8839.
- Alemán-Nava G.S., Cuellar-Bermudez S.P., Cuaresma M. et al. How to use Nile Red, a selective fluorescent stain for microalgal neutral lipids // J. Microbiol. Methods. 2016. V. 128. P. 74–79.
- Chen Z., Song S., Wen Y. et al. Toxicity of Cu (II) to the green alga *Chlorella vulgaris*: a perspective of photosynthesis and oxidant stress // Environ. Sci. Pollut. Res. 2016. V. 23. P. 17910–17918. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6997-2>
- Cid A., Fidalgo P., Herrero C., Abalde J. Toxic action of copper on the membrane system of a marine diatom measured by flow cytometry // Cytometry. Part A. 1996. V. 25. P. 32–36.
- Cid A., Torres E., Herrero C., Abalde J.E. Disorders provoked by copper in the marine diatom *Phaeodactylum*

- tricornutum* in short-time exposure assays // *Cah. Biol. Mar.* 1997. V. 38. P. 201–206.
- Dursun F., Taş S., Koray T. Spring bloom of the raphidophycean *Heterosigma akashiwo* in the Golden Horn Estuary at the northeast of Sea of Marmara // *Ege J. Fish. Aquat. Sci.* 2016. V. 33. № 3. P. 201–207.
- El-Naggar A.H., Sheikh H.M. Response of the green microalga *Chlorella vulgaris* to the oxidative stress caused by some heavy metals // *Life Sci. J.* 2014. V. 11. P. 1349–1357.
- Hamed S.M., Selim S., Klöck G., AbdElgawad H. Sensitivity of two green microalgae to copper stress: growth, oxidative and antioxidant analyses // *Ecotoxicol. Envir. Saf.* 2017. V. 144. P. 19–25.
- Heisler J., Glibert P.M., Burkholder J.M. et al. Eutrophication and harmful algal blooms: a scientific consensus // *Harmful Algae.* 2008. V. 8. P. 3–13.
- Hossain M.A., Piyatida P., Teixeira da Silva J. A., Fujita M. Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation // *J. Bot.* 2012. V. 2012. Art. ID 872875.
<https://doi.org/10.1155/2012/872875>
- Hyka P., Lickova S., Přibyl P. et al. Flow cytometry for development of biotechnological processes with microalgae // *Biotechnol. Adv.* 2013. V. 31. P. 2–16.
- Kempton J., Keppler C.J., Lewitus A. et al. A novel *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) bloom extending from a South Carolina bay to offshore waters // *Harmful Algae.* 2008. V. 7. P. 235–240.
- Luft J.H. Improvements in epoxy resin embedding methods // *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1961. V. 9. P. 409–414.
- Machado M.D., Soares E.V. Modification of cell volume and proliferative capacity of *Pseudokirchneriella subcapitata* cells exposed to metal stress // *Aquat. Toxicol.* 2014. V. 147. P. 1–6.
- Martínez R., Orive E., Laza-Martínez A., Seoane S. Growth response of six strains of *Heterosigma akashiwo* to varying temperature, salinity and irradiance conditions // *J. Plankton Res.* 2010. V. 32. P. 529–538.
- Miazek K., Iwanek W., Remacle C. et al. Effect of metals, metalloids and metallic nanoparticles on microalgae growth and industrial products biosynthesis: a review // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. V. 16. P. 23929–23969.
- Mohamed Z.A., Al-Shehri A.M. The link between shrimp farm runoff and blooms of toxic *Heterosigma akashiwo* in Red Sea coastal waters // *Oceanologia.* 2012. V. 54. № 2. P. 287–309.
- Nagajyoti P.C., Lee K.D., Sreekanth T.V.M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review // *Environ. Chem. Lett.* 2010. V. 8. P. 199–216.
- Perales-Vela H.V., González-Moreno S., Montes-Horcasitas C. et al. Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrasatulus* (Chlorophyceae) // *Chemosphere.* 2007. V. 67. P. 2274–2281.
- Pyč M., Cai Y., Greer M.S. et al. Turning over a new leaf in lipid droplet biology // *Trends Plant Sci.* 2017. V. 22. P. 596–609.
- Reynolds E. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // *J. Cell Biol.* 1963. V. 17. P. 208–212.
- Schmitt F.-J., Renger G., Friedrich T. et al. Reactive oxygen species: Re-evaluation of generation, monitoring and role in stress-signaling in phototrophic organisms // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1837. P. 835–848.
- Shikata T., Yoshikawa S., Matsubara T. et al. Growth dynamics of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) in Hakata Bay, Japan // *Eur. J. Phycol.* 2008. V. 43. P. 395–411.
- Sibi G., Anuraag T.S., Bafila G. Copper stress on cellular contents and fatty acid profiles in *Chlorella* species // *Online J. Biol. Sci.* 2014. V. 14. № 3. P. 209–217.
- Toncheva-Panova T., Merakchiyska M., Djingova R. et al. Effect of Cu²⁺ on the red microalga *Rhodella reticulata* // *Gen. Appl. Plant Physiol.* 2006. Spec. Iss. P. 53–60.
- Yang J.S., Cao J., Xing G.L., Yuan H.L. Lipid production combined with biosorption and bioaccumulation of cadmium, copper, manganese and zinc by oleaginous microalgae *Chlorella minutissima* UTEX2341 // *Bioreour. Technol.* 2015. V. 175. P. 537–544.
- Yruela I. Copper in plants // *Braz. J. Plant Physiol.* 2005. V. 17. P. 145–156.
- Yu J., Yang G., Tian J. The effects of the harmful alga *Heterosigma akashiwo* on cultures of *Schmackeria inopinus* (Copepoda, Calanoida) // *J. Sea Res.* 2010. V. 64. P. 287–294.
- Wang H., Sathasivam R., Ki J.-S. Physiological effects of copper on the freshwater alga *Closterium ehrenbergii* Meneghini (Conjugatophyceae) and its potential use in toxicity assessments // *Algae.* 2017. V. 32. № 2. P. 131–137.

The Cell Ultrastructure and Autotrophic Function of the Raphidophyte Alga *Heterosigma akashiwo* (Y. Hada) Y. Hada ex Y. Hara and M. Chihara, 1987 Under Copper Exposure

Zh. V. Markina

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

The effects of copper (10, 25 and 50 µg/L) on the population growth, physiological state, and ultrastructure of the microalga *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) were studied. Copper had a greater effect on the mitochondrial membrane potential than on chlorophyll *a* fluorescence. The neutral lipid content was lower in exposed than in control cells throughout the experiment. The morphology of organelles was not altered at any concentration of copper; however, the number of vacuoles in the algal cells increased at 25 and 50 µg Cu/L.

Keywords: *Heterosigma akashiwo*, pollution, copper, mitochondria, chlorophyll *a* fluorescence, neutral lipids, ultrastructure

УДК 582.26/.27

НОВЫЕ И МАЛОИЗВЕСТНЫЕ ВИДЫ МАКРОВОДОРОСЛЕЙ ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ МОРЕЙ РОССИИ

© 2021 г. О. С. Белоус^{1, 2, *}, А. В. Скрипцова¹, Т. В. Титлянова¹

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

²Дальневосточный федеральный университет,
Владивосток 690950, Россия

*e-mail: ksu_bio@mail.ru

Поступила в редакцию 05.12.2019 г.

После доработки 12.02.2020 г.

Принята к публикации 12.02.2021 г.

Приведено описание 10 новых и малоизвестных видов макроводорослей, обнаруженных при ревизии гербарного и живого материала, собранного авторами в 2001 г. и в 2018–2019 гг. в зал. Петра Великого Японского моря. Среди них 7 видов – новые для российского побережья Японского моря, 5 видов – новые для флоры дальневосточных морей и 3 вида ранее были указаны для зал. Петра Великого без описания.

Ключевые слова: *Laminariocolax tomentosoides*, *Myrionema foecundum*, *Phaeostroma pustulosum*, *Protectocarpus speciosus*, *Streblonema evagatum*, *Chroodactylon ornatum*, *Sahlingia subintegra*, *Acrochaetium secundatum*, *Kylinia endophytica*, *Colaconema caespitosum*, зал. Петра Великого, новые находки

DOI: 10.31857/S0134347521030025

Согласно наиболее полной сводке (Клочкова, 1998), флора макроводорослей российского Дальнего Востока насчитывает 551 валидный вид. Однако эти сведения не могут считаться окончательными. В начале XXI века флора региона была дополнена (Жигадлова, 2011, 2014), описаны новые для науки виды водорослей (Кепель, 2001; Перестенко, Титлянова, 2002; Клочкова, Крупнова, 2004; Селиванова, 2008; Писарева, Клочкова, 2013; Селиванова, Жигадлова, 2016), повсеместно находили новые для дальневосточных морей виды, в том числе для Японского моря (Левенец и др., 2006; Скрипцова, Калита, 2020). Зал. Петра Великого Японского моря – это самая южная, наиболее тепловодная и богатая по биологическому разнообразию прибрежная акватория Дальнего Востока России. По последним сведениям в общем списке водорослей-макрофитов этой акватории насчитывается 313 видов (Скрипцова, 2019).

При ревизии гербарного материала, собранного авторами в разные годы в зал. Петра Великого, обнаружены виды, ранее не указывавшиеся для залива, в том числе 5 новых для флоры дальневосточных морей России видов (отмечены звездочкой). Три вида ранее были приведены в сводке как новые для флоры зал. Петра Великого

(Скрипцова, 2019), но без описания. Кроме этого, в статье Перестенко и Штрик (2005) упоминалось, что вид *Protectocarpus speciosus* встречается в данной акватории, однако он не отмечен ни в одной из сводок. В настоящей работе приведено описание всех найденных нами видов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Образцы водорослей собраны А.В. Скрипцовой в сентябре–ноябре 2018 г. и в сентябре 2019 г., а также О.С. Белоус в июне–августе 2019 г. и Т.В. Титляновой в июне 2001 г. в зал. Петра Великого (Японское море). Водоросли собирали на литорали, в сублиторали и из выбросов при маршрутном осмотре. Обработку гербарного материала проводили в Лаборатории автотрофных организмов Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского (ННЦМБ) ДВО РАН. Материал определяли с использованием световых микроскопов Carl Zeiss Jena и AxioVert 200M, микрофотографии получены с помощью цифровой фотокамеры AxioCam HRC. При идентификации макроводорослей использовали следующие источники: Vørgesen, 1915; Зинова, 1953, 1967; O'Flaherty, 1966; Abbott, Hollenberg, 1976; Перестенко, 1980,

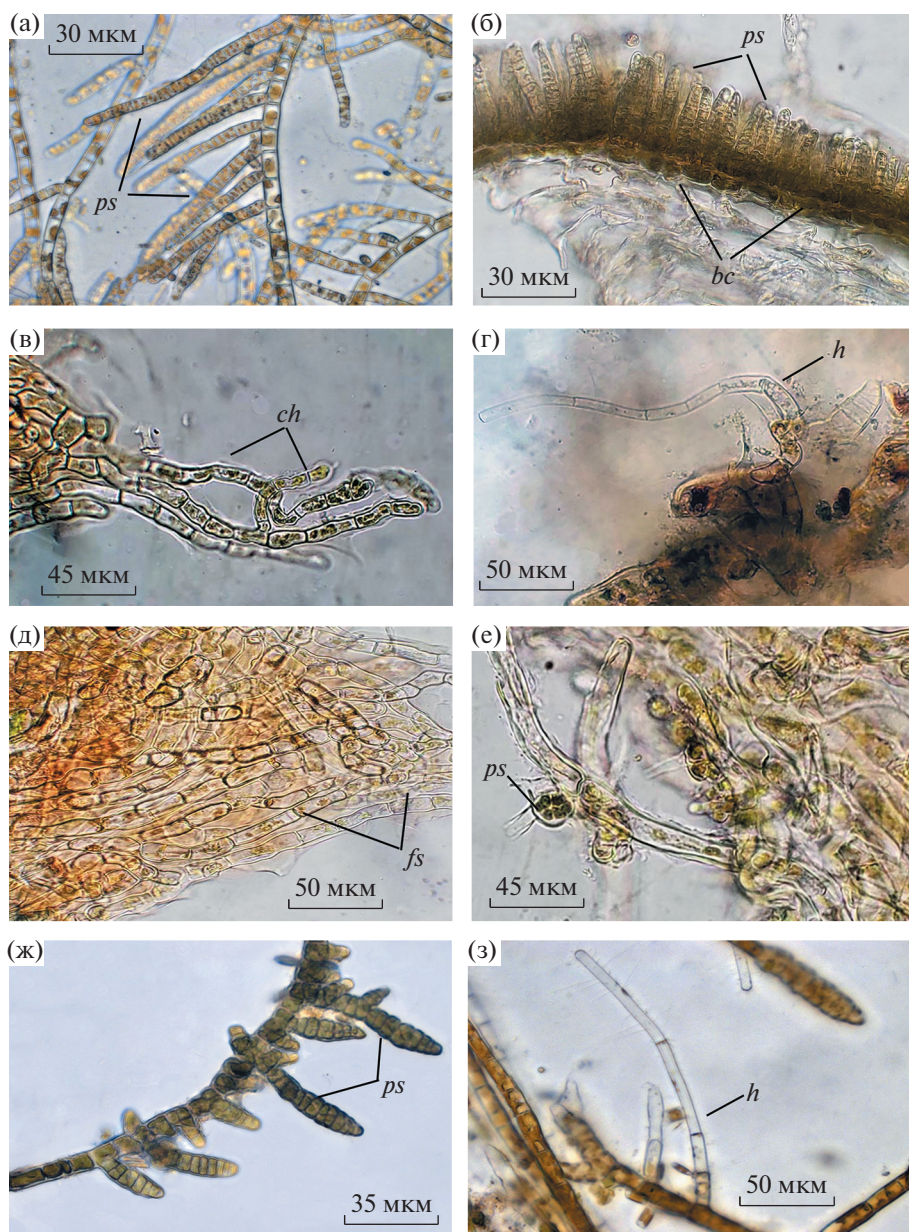


Рис. 1. Морфология водорослей *Laminariocolax tomentosoides* (а), *Myrionema foecundum* (б), *Phaeostroma pustulosum* (в–е), *Protectocarpus speciosus* (ж–з). Условные обозначения: *ps* – многогнездный спорангий, *h* – настоящий волосок, *ch* – хлоропласты, *fs* – клеточные нити, *bc* – базальные клетки.

1994; Kornmann, 1989; Womersley, 1994; Luan, Luan, 1995; Перестенко, Чумаков, 2001; Tseng, 2009; Luan et al., 2013; Titlyanov et al., 2017. Названия таксонов приведены в соответствии с современными систематическими представлениями (Guiry, Guiry, 2019). В примечаниях указано распространение видов в дальневосточных морях России. Обработанный материал хранится в гербарии Лаборатории автотрофных организмов ННЦМБ ДВО РАН. Описание видов составлено по гербарным и живым образцам.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Отдел ОСНРОПНУТА

Класс Phaeophyceae

Порядок Ectocarpales

Семейство Chordariaceae

Laminariocolax tomentosoides (Farlow)

Kylin 1947: 6, fig. 1D–E (рис. 1а)

Слоевище эпифитное, до 1 мм высотой; образовано стелющимися нитями, состоящими из округлых изодиаметрических клеток размером 8–13 мкм. От стелющихся нитей развиваются ко-

роткие и длинные слабо разветвленные вертикальные нити. Клетки вертикальных нитей цилиндрические или слегка расширенные в середине; их длина 5.5–21 мкм, ширина 5.3–8.4 мкм, отношение длины клеток к ширине составляет 1–2(3) : 1. Хлоропласты лентовидные, пристенные; по одному, реже по два в клетке. Настоящие волоски развиваются терминально на боковых веточках длинных вертикальных нитей. Многогнездные спорангии сидячие, длинно-цилиндрические; их длина до 200 мкм, ширина 6–7.5 мкм; однорядные, на отдельных участках редко 2–3-рядные. Развиваются преимущественно односторонне (реже поочередно) на вертикальных или стелющихся нитях. Вид найден в октябре 2018 г. на *Saccharina japonica* (Areschoug) S.E. Lane, C. Mayes, Druehl et G.W. Saunders в б. Сухопутная, 43°05' с.ш. и 131°58' в.д. (зал. Петра Великого, Японское море).

Примечание. Для зал. Петра Великого в сводке Скрипцовой (2019) приведен без описания.

**Myrionema foecundum* (Strömfelt)
Sauvageau 1897: 170 (рис. 1б)

Слоевище эпифитное, в виде маленьких округлых пластин диаметром 0.5–3.0 мм. Базальная часть однослойная. От базальной части пластины развиваются вертикальные простые, конусовидные или цилиндрические нити с тупой вершиной, состоящие из 9–12 клеток; высота нитей 40–45(65) мкм, ширина – 6–8 мкм. Клетки с одним пристенным пластинчатым хроматофором. Настоящие волоски редкие, развиваются между вертикальными нитями на базальной пластине. Одногнездные спорангии отсутствуют. Многогнездные спорангии цилиндрические или конусовидные, сидячие. Во время плодоношения все вертикальные нити становятся плодоносными. Вид найден 20.06.2019 г. на *Punctaria plantaginea* (Roth) Greville у м. Тобизина о-ва Русский, 42°55' с.ш. и 131°55' в.д. (зал. Петра Великого, Японское море).

**Phaeostroma pustulosum* Kuckuck
in Reinbold 1893: 43 (рис. 1в–1е)

Слоевище эпифитное, нитевидное, ветвящееся, стелющееся по поверхности других водорослей. Нити собраны в рыхлые скопления неопределенной формы, формируя псевдопаренхиму. От них под прямым или почти под прямым углом отходят длинные боковые ответвления. Ширина клеток нитей 8–20 мкм, длина клеток в 1–3 раза больше ширины. Хлоропласты многочисленные, пластинчатые. Настоящие волоски диаметром 8–9 мкм, сужаются к верхушке, базальная клетка удлиненная. Одногнездные спорангии неизвестны. Многогнездные спорангии диаметром 10–20 мкм развиваются на вегетативных клетках нитей. Вид

найден в июле 2019 г. в основании слоевища и на подошве *Punctaria plantaginea* (Roth) Greville у м. Ахлестышева о-ва Русский, 42°59' с.ш. и 131°56' в.д. (зал. Петра Великого, Японское море).

**Protectocarpus speciosus* (Børgesen) Kornmann in Kuckuck 1955: 119 (рис. 1ж, 1з; рис. 2а)

Слоевище эпифитное; кустики до 1 мм высотой состоят из моностроматического базального диска и однорядных слабо ветвящихся нитей. Вертикальные нити шириной 8–19 мкм образованы прямоугольными клетками длиной 10–43 мкм. Отношение длины клеток к ширине 1–2 : 1. Хлоропласты крупные, пластинчатые, по одному в клетке. Волоски отходят от базального диска, развиваются между вертикальными нитями или на боковых веточках, часто терминально. Многогнездные спорангии (размер 26–78 × 9–24 мкм) развиваются терминально или латерально; на одноклеточной ножке или сидячие, стручковидные, яйцевидные, овальные, с округлой верхушкой, простые или разветвленные, 1–5-рядные, иногда интеркалярные, гребневидные. Одногнездные спорангии (размер 22–59 × 14–31 мкм) овальные, развиваются в основании вертикальных нитей. Вид найден в сентябре 2018 г. на филлоидах *Sargassum pallidum* (Turner) C. Agardh в б. Сухопутная, 43°05' с.ш. и 131°58' в.д. (зал. Петра Великого, Японское море), а также 5.11.2018 г. в б. Киевка, 42°50' с.ш. и 133°41' в.д. (Японское море) на *Saccharina japonica*.

Примечание. Отмечен в альгофлоре о-ва Сахалин (Перестенко, Штрик, 2005). Авторы упоминают, что этот вид “по неопубликованным данным Л.П. Перестенко, в зал. Петра Великого растет на открытых участках, преимущественно на мысах бухт, в нижнем горизонте литорали и в сублиторали до глубины 4–6 м на скалистом грунте в формации *Phyllospadix iwatensis* и на илисто-песчаном грунте в формации *Zostera marina* на листьях трав” (с. 80). Однако в сводках для зал. Петра Великого *P. speciosus* ранее не указывался.

**Streblonema evagatum* Setchell & N.L. Gardner 1922: 390, pl. 42: figs 1–5 (рис. 2б)

Растение частично эндофитное, состоящее из стелющихся и вертикальных нитей; формирует округлые пятна диаметром 1–2 см. Стелющиеся нити толщиной 3.5–4.0 мкм, неправильно и рыхло ветвящиеся, проникают в ткань хозяина короткими ответвлениями. Вертикальные нити с пучковатым ветвлением, состоят из цилиндрических клеток длиной 7–15 мкм; клетки со слабыми перетяжками у клеточных перегородок, диаметр клеток 4 мкм в основании и 6.5–7.5 мкм в самой широкой части. Хлоропласты лентовидные, 1–2 в

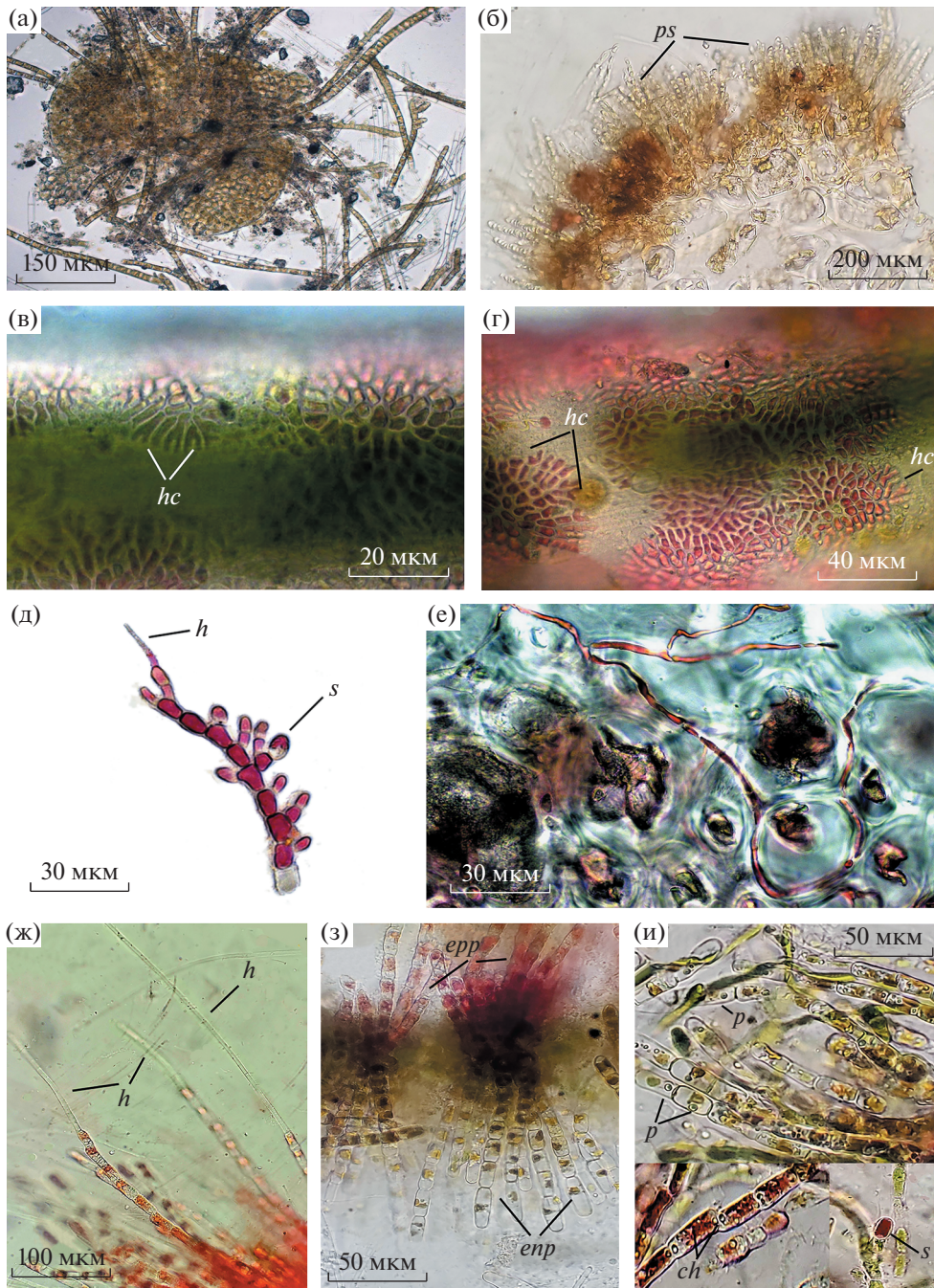


Рис. 2. Морфология водорослей *Protectocarpus speciosus* (а), базальный диск; *Streblospira evagatum* (б); *Sahlingia subintegra* (в, г); *Acrochaetium secundatum* (д); *Kylinia endophytica* (е) внутри слоевища *Ahnfeltiopsis flabelliformis*; *Colaconema caespitosum* (ж–и). Условные обозначения: *p* – пиреноид, *ch* – хлоропласты, *s* – моноспора, *h* – волосок, *epp* – эпифитная часть растения, *enr* – эндофитная часть растения, *ps* – многогнездные спорангии, *hc* – роговидные клетки.

клетке. Волоски отсутствуют. Одногнездные спорангии не обнаружены. Многогнездные спорангии (размер 5.5–6.5 × 65–80 мкм) многочисленные, цилиндрические, однорядные, сидячие или на короткой ножке. Вид найден в июне 2019 г. на *Punctaria*

plantaginea (Roth) Greville в б. Сухопутная, 43°05' с.ш. и 131°58' в.д. (зал. Петра Великого, Японское море).

Примечание. В дальневосточных морях зарегистрирован в Охотском море у о-ва Сахалин (Перестенко, Чумаков, 2001), у Командорских остро-

вов (Selivanova, Zhigadlova, 2013) и у берегов восточной Камчатки (Селиванова, Жигadlova, 2014).

Отдел RHODOPHYTA

Класс Stylonematophyceae

Порядок Stylonematales

Семейство Stylonemataceae

**Chroodactylon ornatum* (C. Agardh)

Basson 1979: 67, pl. IX [9]: fig. 52

Слоевище эпифитное, микроскопическое, нитчатое высотой 0.2–1.0 мм. Прикрепляется базальной клеткой. Нити диаметром 10–20 мкм однорядные, простые или редко разветвленные; состоят из цилиндрических или яйцевидных клеток, включенных в слизистую оболочку. Ветвление неправильно поочередное или почти дихотомическое. В базальной части нитей диаметр клеток (6) 10 мкм, длина 7.5–15 мкм; в верхней части – диаметр клеток 10 мкм, длина 10–20(30) мкм. Хлоропласт звездчатый с центральным пиреноидом, ярко сине-зеленый или от сероватого до буроватого цвета. Специфическая морфология этого вида позволяет с уверенностью его идентифицировать. Найден в июне 2001 г. на *Melanothamnus japonicus* (Harvey) Díaz-Tapia et Maggs в б. Сивучья, 42°26' с.ш. и 130°49' в.д. (зал. Петра Великого Японского моря).

Класс Compsorogonophyceae

Порядок Erythropeltales

Семейство Erythrotrichiaceae

**Sahlingia subintegra* (Rosenvinge)

Kornmann 1989: 227, figs 1, 6–13 (рис. 2в, 2г)

Слоевище эпифитное, микроскопическое, темно-розового или красного цвета; формирует моностроматические, распростертые, одиночные или сливающие диски диаметром 40–65(300) мкм с неровными краями. Диск состоит из разветвленных клеточных нитей. Клетки нитей округло-прямоугольные, в молодых пластинах неправильной формы; полигональные, изодиаметрические в центральной части; их диаметр 3–5 мкм и длина 5–11 мкм. Периферические клетки часто раздвоенные, роговидные, длиной до 15 мкм. Хлоропласт лентовидный, с одним пиреноидом. Вид найден 27.09.2019 г. на слоевище *Cladophora opaca* Sakai у м. Ахлестышева о-ва Русский, 42°59' с.ш. и 131°56' в.д. (зал. Петра Великого, Японское море).

Класс Florideophyceae

Порядок Acrochaetiales

Семейство Acrochaetiaceae

Acrochaetium secundatum (Lyngbye)

Nägeli 1858: 532 (рис. 2д)

Растения эпифитные, высотой до 150 мкм и шириной 7.5 мкм, прикрепляются стелющимися нитями. Вертикальные побеги односторонне разветвленные. Клетки бочонковидные или почти треугольные, расширенные на дистальном конце;

ширина клеток 7–9 мкм, длина – 12–14 мкм. На апикальных клетках боковых веточек формируются волоски длиной до 35 мкм. Моноспорангии (размер 7.7–8.6 × 10.4–12.5 мкм) одиночные, сидячие, развиваются сериями латерально на вертикальных ветвях, преимущественно односторонне. Вид найден в конце сентября 2018 г. на филлоидах *Sargassum pallidum* (Turner) C. Agardh в б. Сухопутная, 43°05' с.ш. и 131°58' в.д. (зал. Петра Великого, Японское море).

Примечание. В дальневосточных морях отмечен для зал. Терпения (о-в Сахалин) (Перестенко, 1994), побережья юго-восточной Камчатки (Селиванова, Жигadlova, 2014) и о-ва Кунашир (Курильские острова) (Скрипцова, Титлянова, 2017). Для зал. Петра Великого в сводке Скрипцовой (2019) приведен без описания.

Kylinia endophytica (Batters) Athanasiadis (рис. 2е)

[=*Colaconema endophyticum* (Batters
J.T. Harper et G.W. Saunders)]

Растение полностью эндофитное, кроме моноспорангиев. Нити неправильно разветвленные, рыхло расположенные. Клетки цилиндрические, диаметром 1.0–2.5 мкм на вершинах нитей и 3.0–4.2 мкм в более старых частях растения; длина клеток 10–30(56) мкм. Вид найден 18 ноября 2018 г. внутри таллома *Ahnfeltiopsis flabelliformis* (Harvey) Masuda в б. Сухопутная, 43°05' с.ш., 131°58' в.д. (зал. Петра Великого, Японское море).

Примечание. В дальневосточных морях вид указывался как *Colaconema endophyticum* для юго-восточной Камчатки (Selivanova, Zhigadlova, 2009; Селиванова, Жигadlova, 2014) и Командорских островов (Selivanova, Zhigadlova, 2013).

Порядок Colaconematales

Семейство Colaconemataceae

**Colaconema caespitosum* (J. Agardh) Jackelman,
Stegenga et J.J. Bolton 1991: 303 (рис. 2ж–2и)

Растение в виде маленьких плотных дернинок или пучков, состоящих из эпифитной и эндофитной частей, хорошо различимых по цвету. Эндофитная часть буровато-зеленоватого цвета, состоит из плотно примыкающих друг к другу клеточных нитей, проникающих в слоевище вдоль и между ассимиляционных нитей растения. Клетки эндофитных нитей бочонковидные или цилиндрические, их диаметр 5.0–12.5 мкм и длина до 18 мкм. Вертикальные эпифитные нити от красного до серовато-красного цвета, раскидистые. Ветвление скудное, двустороннее, одностороннее и супротивное. Верхушки нитей часто заканчиваются длинными бесцветными многоклеточными волосками диаметром 2–4 мкм и длиной до 130 мкм. Клетки нитей цилиндрические длиной 15.6–19.5 (23) мкм, в нижней части нитей диаметр клеток составляет 11–12 мкм, ближе к вершинам – 4.5–6.5 мкм. Клетки содержат (1)2–6 хлоропла-

стов, каждый хлоропласт с центральным пиреноидом. Обычно хлоропласты близко прилегают друг к другу и выглядят как один пристеночный хлоропласт с несколькими пиреноидами. Моноспорангии яйцевидные, их размер 10–14 × 16–20 мкм; сидячие или на ножке, одиночные или в парах, очень редко в группах по 3–5. Вид найден в конце августа 2019 г. на *Chordaria flagelliformis* (O.F. Müller) C. Agardh на северном побережье о-ва Рейнеке, 42°55' с.ш. и 131°44' в.д. (зал. Петра Великого, Японское море).

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследования обнаружено 5 видов макроводорослей, ранее не указывавшихся для флоры дальневосточных морей: *Phaeostroma pustulosum*, *Myrionema foecundum*, *Sahlingia subintegra*, *Colaconema caespitosum* и *Chroodactylon ornatum*.

Виды *Streblonema evagatum* и *Kylinia endophytica* ранее были отмечены в более северных районах Дальнего Востока – на юго-восточном побережье Камчатки, у Командорских островов, в южной части Охотского моря (Selivanova, Zhigadlova, 2013; Селиванова, Жигадлова, 2014) и не были известны для российского побережья Японского моря. Виды *Laminariocolax tomentosoides* и *Acrochaetium secundatum* ранее также указывались для северных районов Дальнего Востока (Клочкова и др., 2009; Скрипцова, Титлянова, 2017) и впервые приведены для российской части Японского моря в сводке А.В. Скрипцовой (2019) без описания. С учетом наших находок общий список водорослей акватории зал. Петра Великого составил 320 видов.

Следует отметить, что большинство из найденных нами видов водорослей широко распространены в Мировом океане. Отсутствие сведений об их встречаемости в дальневосточных морях России, очевидно, обусловлено недостаточной изученностью альгофлоры. Все обнаруженные нами виды являются эпифитами (или частично эндофитами) и имеют мелкие, микроскопические слоевища. Зачастую такие водоросли выпадают из поля зрения исследователей.

Полученные данные показывают, что, несмотря на длительную историю изучения зал. Петра Великого – наиболее исследованной акватории дальневосточных морей, сведения о флоре водорослей-макрофитов в этой акватории нельзя считать исчерпывающими.

Эпифиты как группа водорослей, имеющих микроскопические размеры, в дальневосточном регионе недостаточно изучены (Селиванова, Жигадлова, 2014). Их сбор и идентификация представляют серьезные трудности. Следует отметить, что, если речь идет о водорослях, то эпифиты – это организмы, поселяющиеся не только на поверхности растения-хозяина (голоэпифиты), но и

амфиэпифиты, базальная часть которых проникает во внутренние ткани базифита, а верхняя часть, выступающая над поверхностью хозяина, может быть представлена лишь репродуктивными структурами, и эндофиты, полностью погруженные в тело базифита (Виноградова, 1989). Результаты некоторых исследований показывают, что внимательный анализ эпифитона макрофитов позволяет обнаружить новые для флоры виды (Левенец, 1996; Перестенко, Титлянова, 2002; Жигадлова, 2011; Скрипцова, Калита, 2020). Так, при изучении макрофитообрастателей водорослей рода *Palmaria* из 42 обнаруженных видов 12 оказались новыми для флоры восточной Камчатки, а 9 видов – для дальневосточных морей (Жигадлова, 2011). Наше исследование поддерживает целенаправленное изучение эпифитных водорослей в дальневосточных морях.

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

- Виноградова К.Л. Эпифитизм водорослей: уточнение терминологии // Ботан. журн. 1989. Т. 74. № 9. С. 1291–1293.
- Жигадлова Г.Г. Эпифиты и эндофиты водорослей рода *Palmaria* Stackhouse у берегов восточной Камчатки // Изв. ТИНРО. 2011. Т. 164. С. 300–311.
- Жигадлова Г.Г. Первая находка красной эпифитной водоросли *Pseudorhododiscus nipponicus* Masuda, 1976 (Rhodophyta: Palmariales) в Авачинском заливе (восточная Камчатка) // Биол. моря. 2014. Т. 40. № 3. С. 238–239.
- Зинова А.Д. Определитель бурых водорослей северных морей СССР. М.; Л. 1953. 224 с.
- Зинова А.Д. Определитель зеленых, бурых и красных водорослей южных морей СССР. М.; Л.: Наука. 1967. 398 с.
- Кепель А.А. Новый вид *Hapterophycus* Setch. et Gardn. (Scytosiphonaceae, Phaeophyta) из залива Петра Великого (Японское море) // Альгология. 2001. Т. 11. № 4. С. 462–467.
- Клочкова Н.Г. Водоросли-макрофиты дальневосточных морей России: Автореф. дис. ... док. биол. наук. Петропавловск-Камчатский. 1998. 48 с.
- Клочкова Н.Г., Королева Т.Н., Кусиди А.Э. Атлас водорослей-макрофитов прикамчатских вод. Петропавловск-Камчатский: КамчатНИРО. 2009. Т. 1. 216 с.
- Клочкова Н.Г., Крупнова Т.Н. Новые и интересные таксоны ламинариевых водорослей (Laminariales, Phaeophyta) дальневосточных морей России. *Tauya*

- basicrassa* Kloczc. et Krupn. gen. et sp. nov. // Альгология. 2004. Т. 14. С. 52–61.
- Левенец И.Р. Дополнение к флоре морских водорослей района острова Кунашир (Курильские острова) // Ботан. журн. 1996. Т. 81. № 3. С. 133–137.
- Левенец И.Р., Скрипцова А.В., Попова Л.И. Флористические находки в заливе Петра Великого Японского моря // Ботан. журн. 2006. Т. 91. № 7. С. 1107–1109.
- Перестенко Л.П. Водоросли залива Петра Великого. Л.: Наука. 1980. 232 с.
- Перестенко Л.П. Красные водоросли дальневосточных морей России. СПб.: Ольга. 1994. 330 с.
- Перестенко Л.П., Титлянова Т.В. Дополнение к флоре Японского моря // Новости систематики низш. раст. 2002. Т. 35. С. 18–26.
- Перестенко Л.П., Чумаков А.А. Эпифиты *Laminaria japonica* Aresch. f. *longipes* (Miyabe et Tokida) Ju. Petrov с острова Сахалин // Новости систематики низш. раст. 2001. Т. 35. С. 26–30.
- Перестенко Л.П., Штрик В.А. Новые и интересные виды водорослей острова Сахалин // Новости систематики низш. раст. 2005. Т. 39. С. 75–88.
- Писарева Н.А., Ключкова Н.Г. Два новых вида водорослей рода *Neoabbottiella* (Rhodophyta: Halymeniales) из морей российского Дальнего Востока // Биол. моря. 2013. Т. 39. № 6. С. 411–421.
- Селиванова О.Н. *Fauchea guiryi* sp. n.: первая находка представителя семейства Faucheaceae (Rhodophyta: Rhodumiales) в дальневосточных морях России // Биол. моря. 2008. Т. 34. № 6. С. 396–403.
- Селиванова О.Н., Жигadlova Г.Г. Эпифитон морских бентосных водорослей шельфа восточной Камчатки // Международный журнал приклад. и фундамент. исслед. 2014. № 11. С. 54–58.
- Селиванова О.Н., Жигadlova Г.Г. *Flabellina avachensis* gen. et sp. n. – новый род и вид семейства Delesseriaceae (Rhodophyta) из прикамчатских вод Тихого океана // Биол. моря. 2016. Т. 42. № 3. С. 179–188.
- Скрипцова А.В. Водоросли-макрофиты залива Петра Великого Японского моря // Биота и среда заповед. территорий. 2019. № 3. С. 14–57.
- Скрипцова А.В., Калита Т.Л. Первая находка бурой эндофитной водоросли *Laminariocolax aecidioides* (Rosenvinge) A.F. Peters, 1998 в дальневосточных морях России // Биол. моря. 2020. Т. 46. № 1. С. 45–52.
- Скрипцова А.В., Титлянова Т.В. Дополнение к флоре морских макроводорослей острова Кунашир // Ботан. журн. 2017. Т. 102. С. 936–942.
- Abbott I.A., Hollenberg G.J. Marine algae of California. Stanford, Calif.: Stanford Univ. Press. 1976. 827 p.
- Børgesen F. The marine algae of the Danish West Indies. Part 3. Rhodophyceae (1). Dan. Bot. Ark. № 3. 1915. P. 1–80.
- Guiry M.D., Guiry G.M. AlgaeBase. World-wide electronic publication. National University of Ireland, Galway. 2019. <http://www.algaebase.org> 2.12.2019.
- Kornmann P. *Sahlingia* nov. gen. based on *Erythrocladia subintegra* (Erythropeltiales, Rhodophyta) // Br. Phycol. J. 1989. V. 24. P. 223–228.
- Luan R.-X., Luan S.-J. New materials for Chinese Ectocarpaceae // Acta Phytotaxon. Sin. 1995. V. 33. № 5. P. 506–515.
- Luan R.X., Lu B., Tseng C.K. Flora Algarum Marinarum Sinicarum. Thomus III. Phaeophyta. No. 1 Ectocarpales, Ralfsiales, Sphacelariales, Dictyotales Beijing: Science Press. 2013. 195 p. [in Chinese].
- O'Flaherty M.L. Taxonomy of some endophytic and epiphytic genera of phaeophyta on the Oregon coast, Masters' Thesis. Corvallis, Ore.: Oregon State University. 1966. 73 p.
- Selivanova O.N., Zhigadlova G.G. Marine benthic algae of the South Kamchatka state wildlife sanctuary (Kamchatka, Russia) // Bot. Mar. 2009. V. 52. № 4. P. 317–329.
- Selivanova O.N., Zhigadlova G.G. Marine Benthic Algae of the Commander Islands (Pacific Coast of Russia) with Checklist Revised in 2012 // Int. Scholarly Res. Not. V. 2013. Art. ID 470185. <https://doi.org/10.5402/2013/470185>
- Titlyanov E.A., Titlyanova T.V., Xiubao Li, Hui Huang. Coral reef marine plants of Hainan Island. Beijing: Science Press. 2017. 243 p.
- Tseng C.K. Seaweeds in Yellow Sea and Bohai Sea of China. Beijing: Science Press. 2009. 453 p. [in Chinese].
- Womersley H.B.S. The marine benthic flora of southern Australia. Part III A. Bangiophyceae and Florideophyceae (Acrochaetales, Nemaliales, Gelidiales, Hildenbrandiales and Gigartinales sensu lato). Canberra: Australian Biological Resources Study. 1994. 508 p.

New and Little-Known Species of Macroalgae from the Far Eastern Seas of Russia

O. S. Belous^{a, b}, A. V. Skriptsova^a, and T. V. Titlyanova^a

^aA.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

^bFar Eastern Federal University, Vladivostok 690950, Russia

Descriptions of 10 new and little-known species of macroalgae found during a revision of herbarium and live material collected by the authors from Peter the Great Bay, Sea of Japan, in 2001, 2018, and 2019 are provided in the present report. Of these, seven species are new to the Russian coast of the Sea of Japan, five species are new to the flora of the Far Eastern seas, and three species were previously recorded from Peter the Great Bay without description.

Keywords: *Laminariocolax tomentosoides*, *Myrionema foecundum*, *Phaeostroma pustulosum*, *Protectocarpus speciosus*, *Streblonema evagatum*, *Chroodactylon ornatum*, *Sahlingia subintegra*, *Acrochaetium secundatum*, *Kylinia endophytica*, *Colaconema caespitosum*, Peter the Great Bay, new records

УДК 579.66:579.22:579.26

ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ В ЯПОНСКОМ МОРЕ

© 2021 г. Е. А. Богатыренко^{1, *}, А. В. Ким^{1, 2}, Т. И. Дункай^{1, 3}, А. Л. Пономарева⁴,
А. И. Еськова^{1, 4}, М. Л. Сидоренко^{1, 2}, А. К. Окулов⁴

¹Дальневосточный федеральный университет, Владивосток 690950, Россия

²Федеральный научный центр биоразнообразия ДВО РАН, Владивосток 690022, Россия

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

⁴Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН, Владивосток 690041, Россия

*e-mail: bogatyrenko.ea@dvfu.ru

Поступила в редакцию 09.07.2020 г.

После доработки 05.11.2020 г.

Принята к публикации 10.02.2021 г.

Из трех акваторий Японского моря с разным уровнем антропогенного загрязнения изолированы 137 штаммов мезофильных и психротолерантных углеводородокисляющих бактерий. Определена таксономическая принадлежность культивируемых бактерий из поверхностных вод и донного осадка, которые участвуют в биодеградации нефтяных углеводородов в данном регионе. Выделенные микроорганизмы относятся к филумам Actinobacteria, Firmicutes и Proteobacteria. Впервые углеводородокисляющая способность обнаружена у бактерий *Okibacterium* sp., *Lechevalieria flava*, *Patulibacter* sp., *P. minatonensis*, *Gracilibacillus massiliensis*, *Thalassobacillus* sp., *Virgibacillus dokdonensis*, *Chryseomicrobium amylolyticum*, *Jeotgalibacillus marinus*, *Moraxella osloensis*, *Idiomarina maritima* и *I. piscisalsi*. Полученные результаты позволили расширить знания о возможности биодеградации поллютантов представителями отдельных таксонов в морской среде.

Ключевые слова: биоразнообразие, углеводородокисляющие бактерии, нефть, углеводороды, Японское море

DOI: 10.31857/S0134347521030037

Экосистема Японского моря характеризуется уникальным разнообразием обитающих в нем организмов, что обусловлено своеобразными физико-географическими особенностями региона. Вместе с тем здесь наблюдается высокая степень антропогенного воздействия, связанная с увеличением численности населения, урбанизацией побережий, индустриализацией и развитием туризма. Источниками загрязнения Японского моря являются объекты целлюлозно-бумажной, электроэнергетической и нефтегазодобывающей промышленности, жилищно-коммунального хозяйства, а также судостроительные и судоремонтные предприятия, торговый и военно-морской флот. Высокая антропогенная нагрузка в прибрежье и в районах активного судоходства неизбежно приводит к хроническому загрязнению этих акваторий различными поллютантами, в том числе нефтью и нефтепродуктами (Огородникова, 2001).

Для сохранения и поддержания стабильности морских экосистем необходимы разработка и внедрение экологически безопасных методов борьбы с последствиями возможных нефтяных и топливных разливов. Наиболее перспективным способом решения этой проблемы может стать

биоремедиация с использованием широких возможностей метаболического потенциала морских микроорганизмов. Поиск микроорганизмов, способных к деструкции нефтяных углеводородов (НУ), в частности, в условиях низких температур, является актуальной научной задачей.

Исследования, проведенные в последние годы, свидетельствуют о целесообразности использования для биоремедиации аборигенных микроорганизмов, которые способны к деградации НУ в определенных экологических условиях. В связи с этим особое внимание необходимо уделять изучению видового разнообразия и биологических свойств микроорганизмов в конкретном регионе.

К наиболее распространенным в морской среде углеводородокисляющим микроорганизмам (УВОМ) относятся бактерии родов *Mycobacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus* и *Arthrobacter*. Как правило, их выделяют в районах с сильным нефтяным загрязнением (Коронелли и др., 1987, 1994; Алекперова, 2009). Способностью к окислению НУ обладают также бактерии родов *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Bacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus* и *Pseudomonas*. Другие представители УВОМ более специфичны для отдельных аквато-

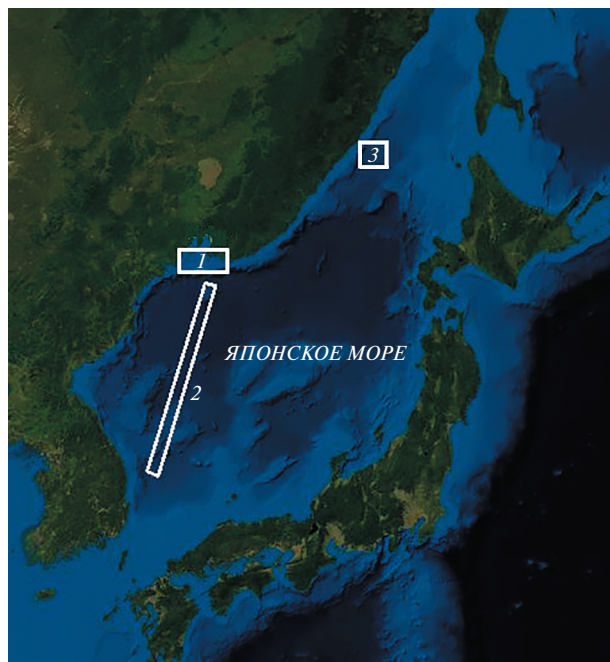


Рис. 1. Районы исследований в Японском море. 1 – зал. Петра Великого, 2 – западная часть Японского моря, 3 – северная часть Японского моря.

рий. Так, например, в Персидском заливе выявлены углеводородокисляющие виды родов *Haloferax*, *Halobacterium* и *Halococcus* (Al-Maillem et al., 2010). В Индийском океане обнаружены новые виды протеобактерий с углеводородокисляющей активностью, это *Altererythrobacter marinus* (Lai et al., 2009) и *Nitratireductor indicus* (Lai et al., 2011). К уникальным УВОМ Жёлтого моря отнесены бактерии родов *Algoriphagus*, *Aestuariaibacter*, *Celeribacter*, *Fabibacter*, *Zobellia*, *Tenacibaculum*, *Citricella*, *Roseivirga*, *Winogradskyella*, *Thioclava*, *Polaribacter* и *Pelagibaca* (Wang et al., 2014).

Информация об УВОМ дальневосточных морей в научной литературе практически отсутствует. В результате исследования микробиоты Берингова моря выявлена способность к деструкции НУ у бактерий родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Pseudobacterium*, *Achromobacter*, *Bacterium* и *Brevibacterium* (Израэль, Цыбань, 1989). Нефтеокислители Охотского моря представлены видами родов *Cobetia*, *Pseudoalteromonas*, *Oceanisphaera*, *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Marinomonas* и *Thalassospira* (Buzoleva et al., 2017).

Сведений об углеводородокисляющей микробиоте Японского моря и её участии в самоочищении экосистемы также недостаточно, несмотря на хроническое загрязнение этого региона нефтепродуктами. Публикации в основном посвящены исследованию сезонной динамики численности УВОМ в прибрежных районах с разной антропогенной нагрузкой (Бойченко и др., 2009). В ряде работ определены нефтеокисляющие свойства отдельных штаммов бактерий, выделенных из по-

верхностных вод, а также рассмотрена возможность их использования для биоремедиации (Nara et al., 2003; Chaegun et al., 2004; Голозубова и др., 2018). Японские авторы (Tanaka et al., 2008) на основе результатов молекулярно-генетических исследований прибрежных вод Японского моря высказали предположение о существенной роли цианобактерий и представителей рода *Alcanivorax* в самоочищении данного района. Таким образом, в настоящее время отсутствуют сведения о комплексных исследованиях таксономического состава и свойств УВОМ в водной толще и донных осадках Японского моря.

Цель нашей работы – изучение таксономического разнообразия культивируемых углеводородокисляющих бактерий из поверхностных вод и донных осадков Японского моря.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Характеристика районов исследования и отбор проб

Материалом для работы послужили пробы поверхностных вод и верхнего окисленного слоя донных осадков Японского моря, полученные в 2018 и 2019 гг. в ходе экспедиционных работ на НИС “Академик М.А. Лаврентьев” (рейсы № 81 и 88), а также во время береговых экспедиций. Исследования проводили на 50 станциях в трех районах: в северной части Японского моря (между $43^{\circ}25'$ и $44^{\circ}36'$ с.ш.; $136^{\circ}32'$ и $137^{\circ}51'$ в.д.), в зал. Петра Великого (между $42^{\circ}16'$ и $43^{\circ}09'$ с.ш.; $130^{\circ}56'$ и $133^{\circ}02'$ в.д.) и в западной части Японского моря (между $36^{\circ}42'$ и $42^{\circ}13'$ с.ш.; $130^{\circ}12'$ и $131^{\circ}13'$ в.д.) (рис. 1).

Все исследованные районы испытывают мощное влияние антропогенного пресса, включая загрязнение нефтью и нефтепродуктами. На большей части береговой линии зал. Петра Великого располагаются населенные пункты, промышленные и сельскохозяйственные предприятия, железная дорога. На акватории залива находятся крупные морские порты Владивосток, Находка, Большой Камень и Посыет, а также специализированный морской нефтеналивной порт Козьмино. По результатам исследований, проведенных в 2017 г., в большинстве прибрежных акваторий зал. Петра Великого отмечено увеличение численности нефтеокисляющего бактериопланктона (Доклад..., 2018).

Станции отбора проб в северной и западной частях Японского моря также находились в районах активного судоходства. Акватории в западной части моря испытывают влияние терригенных стоков крупных населенных пунктов Корейской Народно-Демократической Республики и Республики Корея. В северной части Японского моря станции отбора проб находились в зоне холодного Приморского течения. На берегу этого района отсутствуют крупные населенные пункты, однако здесь расположены предприятия по добы-

че бора, олова, свинца и других полиметаллических руд (ЗАО “Горно-химическая компания Бор”, АО “ГМК “Дальполиметалл”).

Образцы осадков получали, руководствуясь нормативными документами, а также методическими рекомендациями и требованиями к отбору проб донных отложений водных объектов для анализа на загрязненность (ПНД Ф 12.1:2.2.2.2.3:3.2–03). В зависимости от расположения станций глубина отбора проб донных осадков варьировала от 5 до 3670 м от поверхности моря. В морских экспедициях для отбора донных отложений использовали гравитационную геологическую трубку. Трубка имела утяжеленную конструкцию; длина приемной части керна составляла 4 м. В береговых экспедициях пробы брали пробоотборником из нержавеющей стали объемом 500 мл. Окисленный слой стерильно отбирали ложкой во флакон для хранения. С момента отбора проб до начала исследований образцы хранили в морозильной камере при температуре -30°C .

Для микробиологического анализа поверхностных вод с помощью батометра Паталаса с глубины 2–5 м отбирали по 1.5 л морской воды, которую пропускали через полимерные фильтры (Millipore, США) с диаметром пор 0.22 мкм. Полученные пробы использовали для дальнейших исследований.

Выделение углеводородокисляющих бактерий из проб воды и донных осадков

Для получения коллекции культур углеводородокисляющих бактерий (УВОБ) в качестве источника НУ использовали флотский мазут как один из нефтепродуктов, наиболее характерных для антропогенного загрязнения морской среды. Для создания накопительных культур УВОБ донные осадки и фильтры с биомассой помещали в минеральную среду Ворошиловой–Диановой со стерильным флотским мазутом (2.5%) в качестве единственного источника углерода (Патент РФ № 2520084). В состав минеральной среды (г/л дистиллированной воды) входили $\text{NaCl} - 10.0$, $\text{NHNO}_3 - 1.0$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 1.0$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1.0$, $\text{MgSO}_4 - 0.2$, $\text{CaCl}_2 - 0.02$ и $\text{FeCl}_2 - 2$ капли насыщенного раствора. Инкубацию проводили в течение 10 сут при температуре 22°C и 30 сут при температуре 5°C . Для получения чистых культур УВОБ их высевали на аналогичную агаризованную среду и выращивали в тех же условиях. После инкубации полученные изолированные колонии переносили на свежую среду для дальнейшей работы.

Для изучения физиологических особенностей полученных микробных штаммов проводили их инкубацию на среде Ворошиловой–Диановой с добавлением 2.5% мазута, летнего дизельного топлива или нефти марки “Vityaz” при температуре 22°C в течение 7–15 сут и при температуре 5°C в течение 15–30 сут. Отмечали способность

каждого штамма расти на среде с тем или иным субстратом при средней и низкой температуре.

Молекулярно-генетическая идентификация углеводородокисляющих бактерий и филогенетический анализ

Геномную ДНК из культур бактерий выделяли с помощью коммерческого набора “Genomic DNA purification kit” (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя. Фрагмент гена 16S рРНК амплифицировали с использованием пары праймеров 27F (5'-AGAGTTT-GATCATGGCTCAG-3') и 1350R (5'-GACGGGCG-GTGTGTACAAG-3') (Lane et al., 1985). Продукты ПЦР в электрофорезной камере разделяли в 1% агарозном геле с добавлением этидиум бромидом. Продукты амплификации нужной длины вырезали из геля и экстрагировали, замораживая при температуре -80°C (30 мин) и центрифугируя при 13.4 тыс. об/мин в течение 20 мин. Полученные ПЦР-продукты секвенировали по методу Сэнгера, используя набор реактивов “Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit” (Thermo Fisher Scientific, США), на генетическом анализаторе ABI 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems, США) в ЦКП “Биотехнология и геновая инженерия” ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН.

Филогенетический анализ проводили путем поиска гомологичных последовательностей в международном банке данных (GenBank) с помощью программы BLAST (Altschul et al., 1997) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Редактирование последовательностей выполнено в редакторе BioEdit; для выравнивания последовательностей использовали алгоритм программы CLUSTAL W (<http://www.genebee.msu.su/clustal>). Филогенетическое дерево построено с использованием метода ближайших соседей (neighbor-joining) на основе алгоритма Kimura two-parameters в программе MEGA 7 (Kumar et al., 2016). Показатель достоверности порядка ветвления определяли на основании bootstrap-анализа 100 альтернативных деревьев.

Нуклеотидные последовательности фрагментов гена 16S рРНК отдельных штаммов бактерий депонированы в базе данных GenBank под номерами: MT280154, MT328549–MT328554, MT328559, MT328563–MT328565, MT328567, MT328568, MT328609, MT328610, MT328615, MT328619, MT328624, MT328625, MT328631, MT328634, MT328635, MT328639, MT328736, MT328737, MT328750, MT328751, MT328759, MT328760, MT328762, MT328781, MT328782, MT328802, MT328803, MT328827, MT328828, MT328859, MT328902, MT332430, MT332431, MT332685, MT332706, MT332713, MT333204, MT333206, MT333207, MT333220, MT333236, MT333237, MT333245 и MT337509. В базу данных внесены сведения о микроорганизмах, идентифицированных нами до вида, о психротолерантных штаммах бактерий, а также о тех бактериальных штаммах, для которых углеводородокисляю-

Таблица 1. Субстратная специфичность психротолерантных штаммов бактерий, выделенных из Японского моря

Станция отбора проб, координаты	Источник выделения штамма	Вид и название штамма (асс. № гена 16S рРНК)	Рост при температуре 5°C			
			ЛТД	мазут	нефть	
Зал. Петра Великого (порт Находка), 42°49' N, 132°54' E	Вода	<i>Micrococcus yunnanensis</i> NH_8-1K (MT280154)	+	+	—	
		<i>Enterobacter</i> sp. NH_8-3K (MT328552)	+	+	—	
		<i>Bacillus mycoides</i> NH_8-6K (MT328549)	+	+	—	
Зал. Петра Великого, 42°43' N, 131°59' E	Осадки, 67 м	<i>Rhodococcus</i> sp. AP_21102 (MT328750)	+	+	—	
		<i>Thalassobacillus</i> sp. AP_21102-3 (MT332713)	+	+	+	
		<i>Planomicrobium chinense</i> AP_21102-5 (MT332706)	+	+	+	
		<i>Okibacterium</i> sp. AP_21104-1 (MT328563)	+	+	+	
		<i>Bacillus subtilis</i> AP_211722-1 (MT328615)	+	+	+	
Зал. Петра Великого, 42°28' N, 132°34' E	Осадки, 232 м	<i>Mycolicibacterium vanbaalenii</i> AP_211823-1 (MT328635)	+	+	+	
			<i>Paenibacillus ehimensis</i> AP_211823-3 (MT328625)	+	+	+
Зал. Петра Великого, 42°30' N, 132°41' E	Осадки, 174 м	<i>Idiomarina piscisalsi</i> AP_212229 (MT328631)	+	+	+	
			<i>Williamsia muralis</i> LV81-1jGC_4S (MT328759)	+	+	+
Зал. Петра Великого, 42°39' N, 133°02' E	Осадки, 90 м	<i>Patulibacter minatonensis</i> LV81-1jGC_13S (MT328781)	+	+	—	
			<i>Bacillus thuringiensis</i> LV81-1jGC_14S (MT333237)	+	+	+
			<i>Williamsia</i> sp. LV81-01GC_5S (MT328782)	+	+	+
			<i>Micrococcus</i> sp. LV81-01GC_15S (MT328564)	+	+	+
Северная часть Японского моря, 43°34' N, 137°45' E	Осадки, 3617 м	<i>Bacillus thuringiensis</i> LV81-01GC_16S (MT328828)	+	+	+	
			<i>Williamsia</i> sp. LV81-01GC_5S (MT328782)	+	+	+
Северная часть Японского моря, 43°25' N, 137°51' E	Осадки, 3656 м	<i>Micrococcus</i> sp. LV81-01GC_15S (MT328564)	+	+	+	
			<i>Bacillus thuringiensis</i> LV81-01GC_16S (MT328828)	+	+	+
			<i>Williamsia</i> sp. LV81-01GC_5S (MT328782)	+	+	+

Примечание. ЛТД – летнее дизельное топливо.

шая способность показана впервые в нашем исследовании.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе изучения материала, отобранного на 50 станциях в Японском море, в пробах с 42 станций обнаружены накопительные культуры УВОБ. Со всех точек отбора всего удалось выделить 137 штаммов бактерий: 49 из донных осадков и 88 из поверхностных вод.

Изучение таксономического положения полученных культур показало, что они относятся к бактериям филумов Actinobacteria, Firmicutes и Proteobacteria. Доля штаммов филума Actinobacteria, выделенных из воды, составила 55.68% (49 штаммов), из донных осадков – 59.18% (29 штаммов). Доля штаммов филума Firmicutes, выделенных из воды, составила 29.54% (26 штаммов), из донных осадков – 32.66% (16 штаммов). Proteobacteria оказались наименее представленной

группой: из воды выделено 13 штаммов (14.78%), из осадков – 4 штамма (8.16%).

Микробиота филума Actinobacteria была представлена 11 родами и 17 видами. По количеству выделенных изолятов доминировали бактерии родов *Micrococcus* (20 изолятов, отнесенных к *Micrococcus* sp., *M. luteus* и *M. yunnanensis*) и *Corynebacterium* (18 изолятов, отнесенных к *Corynebacterium* sp.). Остальные штаммы актинобактерий идентифицированы как *Mycolicibacterium vanbaalenii*, *Rhodococcus fascians*, *Rhodococcus* sp., *Williamsia muralis*, *Williamsia* sp., *Microbacterium* sp., *Okibacterium* sp., *Arthrobacter* sp., *Lechevalieria flava*, *Streptomyces* sp., *Patulibacter minatonensis* и *Patulibacter* sp.

Филум Firmicutes был представлен 10 родами и 16 видами. Чаще других из среды выделяли бактерий рода *Bacillus* (28 изолятов, отнесенных к *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. aquimaris* и *B. thuringiensis*). Остальные штаммы идентифицированы как *Gracilibacillus massiliensis*, *Psychrobacillus soli*, *Thalassobacillus* sp., *Virgibacillus dokdonensis*, *Paenibacillus ehimensis*, *P. polymyxa*, *Chry-*

seomicrobium amylolyticum, *Jeotgalibacillus marinus*, *Planococcus halocryophilus* и *Planomicrobium chinense*.

К Proteobacteria относились бактерии семи родов и 10 видов. Больше всего изолировано видов рода *Acinetobacter* (*A. johnsonii*, *A. marinus*, *Acinetobacter* sp.). Из других представителей протеобактерий обнаружены виды *Idiomarina maritima*, *I. piscisalsi*, *Enterobacter* sp., *Cobetia marina*, *Thalassolituus oleivorans*, *Moraxella osloensis* и *Pseudomonas* sp.

На следующем этапе работы изучали способность выделенных штаммов расти на средах с нефтью и нефтепродуктами (летнее дизельное топливо и флотский мазут) при температуре 22° и 5°C. В результате было показано, что при температуре 22°C на средах с данными субстратами росли все штаммы исследованных бактерий. При температуре 5°C на средах с дизельным топливом и мазутом росли 17 штаммов бактерий, а на среде с нефтью – лишь 12 штаммов (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

Таксономическое разнообразие углеводородокисляющих бактерий, изолированных из воды и донных осадков Японского моря

Полученная нами коллекция представлена преимущественно грамположительной микробиотой, в то время как наиболее активные виды УВОБ из ближайшего Охотского моря были грамотрицательными (Buzoleva et al. 2017). Возможно, что микробные сообщества Японского моря в выбранных нами акваториях испытывают большее влияние терригенных стоков, чем сообщества Охотского моря. В целом углеводородокисляющая микробиота осадков характеризовалась более высоким разнообразием, чем таковая воды, что, вероятно, связано с выраженной неоднородностью физико-химических характеристик донных отложений на разных глубинах.

Анализ данных показывает, что в полученной нами коллекции культивируемых УВОБ Японского моря представлены как типичные окислители нефтеуглеводородов, так и уникальные.

Согласно литературным данным, виды обнаруженных нами родов *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus* (*Paenibacillus*), *Acinetobacter* и *Arthrobacter* довольно часто встречаются в морской среде и обладают углеводородокисляющей способностью. На основе этих микроорганизмов созданы некоторые коммерческие препараты для устранения нефтяных загрязнений (Das, Chandran, 2011). Углеводородокисляющие изоляты *Microbacterium* чаще всего выделяют из почвы, но опубликованы сведения и о морских углеводородокисляющих представителях этого таксона (Dashti et al., 2015). Таким образом, подавляющее большинство нашей коллекции относится к группе наиболее распространенных в водной и почвенной среде УВОМ.

Особого внимания заслуживают полученные нами штаммы бактерий, у которых углеводородокисляющая способность обнаружена впервые (рис. 2). Среди представителей филума Firmicutes это *Gracilibacillus massiliensis*, *Thalassobacillus* sp., *Virgibacillus dokdonensis*, *Chryseomicrobium amylolyticum* и *Jeotgalibacillus* (*Marinibacillus*) *marinus*.

У штамма *Thalassobacillus* sp. AP_21102-3 (MT332713) выявлена высокая степень родства (99.29%) с изолятами, полученными из воды (MH410548) и засоленной почвы (MH627225). Углеводородокисляющая активность бактерий этого рода пока не изучена, хотя опубликованы сведения о способности штамма *Thalassobacillus devorans* G-19.1T (AJ717299) разлагать фенол (García et al., 2005).

Ближайшим гомологом штамма *Chryseomicrobium amylolyticum* AP_213962 (MT337509) стал *C. amylolyticum* 0136 (KP236269), выделенный с морской водоросли *Thalassia hemprichii* из прибрежной зоны Китая. Разные виды *Chryseomicrobium* ранее были обнаружены также в донных отложениях Аравийского моря (Farha et al., 2018) и в воде Бенгальского залива (Aroga et al., 2011).

Интересно отметить, что нуклеотидная последовательность штамма *Jeotgalibacillus marinus* VL_204M (MT332685) имела одинаково высокий процент гомологии (99.74%) с изолятами с противоположных частей Земли: *Marinibacillus* (*Jeotgalibacillus*) *marinus* R-42990 (FR691459) получен из Антарктики, а *Marinibacillus* (*Jeotgalibacillus*) sp. NP15 (EU196342) – с Канадского Арктического архипелага.

Примечательно, что ближайшими гомологами штаммов *Virgibacillus dokdonensis* AP_215685 (MT333236) и *Gracilibacillus massiliensis* AP_214468 (MT333207) являются культуры, полученные из кишечника трепангов (Echinodermata: Holothuroidea). Известно, что по типу питания трепанги детритофаги-грунтоеды, и этим обусловлено обилие в их пищеварительном тракте почвенных микроорганизмов, особенно представителей семейства Bacillaceae (Bogatyrenko, Buzoleva, 2016). Согласно литературным данным, виды родов *Virgibacillus* и *Gracilibacillus* часто являются галофилами и характерны для экосистем почв, морей и озер (Guan et al., 2017; Zeaiter et al., 2019).

У четырех видов бактерий филума Actinobacteria *Okibacterium* sp., *Lechevalieria flava*, *Patulibacter* sp. и *Patulibacter minatonensis* способность утилизировать НУ обнаружена впервые. Анализ нуклеотидной последовательности штамма *Okibacterium* sp. AP_21104-1 (MT328563) показал одинаковый процент гомологии (98.85%) с почвенными штаммами, зарегистрированными в GenBank под номерами KJ482856 и MF872597. Чаще всего изоляты *Okibacterium* выявляют среди ассоциантов разных видов растений (Evtushenko et al., 2002; Wang et al., 2015). Нам удалось впервые выделить эти бактерии из морских донных отложений.

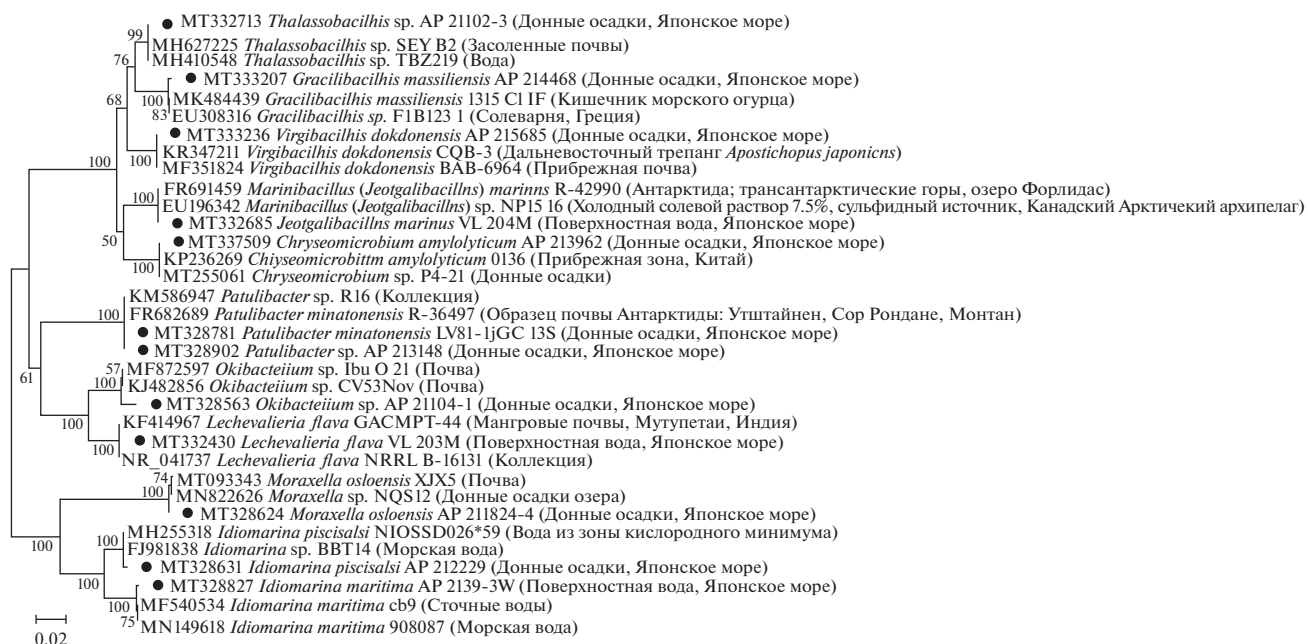


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа последовательностей фрагментов гена 16S рНК бактерий, изолированных из воды и донных осадков Японского моря, для которых углеводородокисляющая способность показана впервые. Дендрограмма построена на основе алгоритма метода объединения ближайших соседей (NJ). Последовательности, полученные в данной работе, отмечены чёрным кружком. Масштаб соответствует двум нуклеотидным заменам на каждые 100 п.н. Представлены значения бутстреп поддержки выше 50%.

Штамм *Lechevalieria flava* VL_203M (MT332430) выделен из воды бухты Золотой Рог (зал. Петра Великого). Микроорганизмы этого вида относятся к семейству Pseudonocardiaceae и в большинстве случаев выделяются из почвы. *L. flava* известен как продуцент мадумицина – антибиотика класса стрептограмминов (Gauze et al., 1974).

Бактерии рода *Patulibacter* найдены и описаны относительно недавно (Takahashi et al., 2006). Как правило, они встречаются в почве и в ризосфере некоторых растений. Сравнительный анализ показал, что обе полученные нами культуры *Patulibacter* имеют высокую степень генетического сходства друг с другом и кластеризуются с коллекционными штаммами и со штаммами, выделенными из почвы Антарктиды.

Среди представителей филума Proteobacteria, у которых впервые обнаружена углеводородокисляющая активность, оказались три вида: *Moraxella osloensis*, *Idiomarina maritima* и *I. piscisalsi*. Бактерии вида *M. osloensis* относятся к условно-патогенной микробиоте человека и способны вызывать пневмонию, менингит, синусит и ряд других инфекционных заболеваний. Нуклеотидная последовательность полученного нами штамма *M. osloensis* AP_211824-4 (MT328624) имела наибольшее сходство (99.62%) с таковой штаммов, полученных из почвы (MT093343) и донных осадков озера (MN822626). Сведения об использовании бактериями этого вида НУ в качестве единственного источника углерода расширяют знания о возможности существования условно-патогенных микроорганизмов вне организма хозяина.

Ко времени написания данной статьи к роду *Idiomarina* относили 30 видов бактерий, характерной особенностью которых является способность расти в условиях высокой солености (до 15%). В ходе нашей работы из донных осадков выделен штамм *I. piscisalsi* AP_212229 (MT328631), а из поверхностной воды – штамм *I. maritima* AP_2139-3W (MT328827). Нуклеотидные последовательности обоих штаммов имели наибольшее сходство с изолятами, полученными из морской среды.

Необходимо отметить, что большинство видов бактерий, углеводородокисляющая активность которых впервые описана в нашей работе, выделены из зал. Петра Великого вблизи урбанизированных территорий. Вероятно, в условиях хронического антропогенного загрязнения различными поллютантами формируются сообщества микроорганизмов, устойчивые к действию высоких концентраций нефтеуглеводородов.

Углеводородокисляющая активность выделенных штаммов бактерий

Все штаммы, проявившие способность к росту на среде с НУ в качестве единственного источника углерода при температуре 5°C, хорошо росли и при более высокой температуре, что указывает на их психротолерантность. Эта группа микроорганизмов демонстрирует активность при температуре 5°C или ниже независимо от их максимальной или оптимальной температуры роста. Несоответствие температурного оптимума микроорганизмов и температуры их естественной среды обитания может быть

связано с культивированием микроорганизмов в лабораторных условиях, когда невозможно воссоздать особенности морской среды в полной мере.

Отметим, что психротолерантные углеводородокисляющие штаммы бактерий выделены преимущественно из донных осадков, но с разных глубин (от 67 до 3656 м). Исключением были 3 штамма, изолированные из поверхностных вод порта Находка – акватории Японского моря с хроническим загрязнением нефтепродуктами. Психротолерантные микроорганизмы были представлены как известными УВОБ, так и видами, для которых углеводородокисляющая активность описана впервые (*Thalassobacillus* sp., *Idiomarina piscisalsi*, *Patulibacter minatonensis*, *Okibacterium* sp.).

К настоящему времени опубликованы ограниченные сведения о видовом разнообразии и углеводородокисляющей способности микроорганизмов дальневосточных морей, несмотря на то, что в регионе ведется активная добыча нефти, а многие прибрежные акватории испытывают влияние хронического техногенного загрязнения. Проведенные нами комплексные исследования таксономического разнообразия культивируемых бактерий Японского моря позволили выявить как типичные для водных и почвенных сообществ виды УВОБ, так и ряд уникальных видов. В дальнейшем коллекция бактериальных штаммов может быть использована при создании на их основе препаратов для ликвидации нефтяных загрязнений в дальневосточных морях.

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

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-74-00028). Образцы воды и донных осадков получены в ходе экспедиционных работ, выполненных в рамках государственного задания Тихоокеанского океанологического института ДВО РАН “Исследование состояния и изменений природной среды на основе комплексного анализа и моделирования гидрометеорологических, биогеохимических, геологических процессов и ресурсов Дальнего Востока” (FWM-2019-0006) и при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 18-05-00153, № 20-55-50005, № 20-35-70014), Комплексной программы фундаментальных исследований ДВО РАН “Дальний Восток” на 2018–2020 гг. (№ 20-ВАНТ-010, 18-1-008) и проектов ВАНТ (VAST № QTRU 02.02/20-21, QTRU.02.05/19-20).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны научному составу экспедиции рейсов № 81 и 88 НИС “Академик М.А. Лаврентьев” за совместную работу, а также благодарят капитана В.Б. Птушкина и экипаж судна за обеспечение проведенных работ. Авторы выражают благодарность ст. н. с. Лаборатории биотехнологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН А.П. Тюнину за помощь в проведении молекулярно-генетических исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алекперова А.И.* О роли нефтеокисляющих бактерий в самоочищении загрязненного нефтью Самур-Апшеронского шельфа Каспийского моря // Вестн. МГОУ. 2009. № 2. С. 6–9.
- Бойченко Т.В., Христофорова Н.К., Бузолева Л.С.* Микробная индикация прибрежных вод северной части Амурского залива // Изв. ТИНРО. 2009. Т. 158. С. 324–333.
- Голозубова Ю.С., Бузолева Л.С., Богатыренко Е.А. и др.* Нефтеокисляющие свойства бактерий рода *Micrococcus*, выделенных из бухты Находка залива Петра Великого (Японское море) // Самар. науч. вестн. 2018. Т. 7. № 2(23). С. 13–16.
- Доклад об экологической ситуации в Приморском крае в 2017 году // Приморская газета. 2018. № 75 (1569).
- Израэль Ю.А., Цыбань А.В.* Антропогенная экология океана. Л.: Гидрометеиздат. 1989. 528 с.
- Коронелли Т.В., Ильинский В.В., Янушка В.А., Красникова Т.И.* Углеводородокисляющая микрофлора акваторий Балтийского моря и Куршского залива, загрязненных при разливе мазута // Микробиология. 1987. Т. 56. № 3. С. 472–478.
- Коронелли Т.В., Дермичева С.Г., Ильинский В.В.* Видовая структура углеводородокисляющих бактериоценозов водных экосистем разных климатических зон // Микробиология. 1994. Т. 63. № 5. С. 917–923.
- Огородникова А.А.* Эколого-экономическая оценка воздействия береговых источников загрязнения на природную среду и биоресурсы залива Петра Великого. Владивосток: ТИНРО-центр. 2001. 193 с.
- Патент РФ № 2520084. 2014. Бузолева Л.С. Способ учета нефтеокисляющих бактерий в морской воде.
- ПНД Ф 12.1:2.2:2.3:3.2–03 “Методические рекомендации. Отбор проб почв, грунтов, донных отложений, илов, осадков сточных вод, шламов промышленных сточных вод, отходов производства и потребления”. М.: Министерство природных ресурсов РФ. 2003.
- Al-Mailem D.M., Sorkhoh N.A., Al-Awadhi H. et al.* Biodegradation of crude oil and pure hydrocarbons by extreme halophilic archaea from hypersaline coasts of the Arabian Gulf // Extremophiles. 2010. V. 14. P. 321–328.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A. et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. P. 3389–3402.
- Arora P.K., Chauhan A., Pant B. et al.* *Chryseomicrobium imtechense* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Planococcaceae* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2011. V. 61. № 8. P. 1859–1864.
- Bogatyrenko E.A., Buzoleva L.S.* Characterization of the gut bacterial community of the Japanese sea cucumber *Apostichopus japonicus* // Microbiology. 2016. V. 85. № 1. P. 116–123.

- Buzoleva L.S., Bogatyrenko E.A., Repina M.A., Belkova N.L. Oil-oxidizing activity of bacteria isolated from south Sakhalin coastal waters // *Microbiology*. 2017. V. 86. № 3. P. 338–345.
- Chaerun S.K., Tazaki K., Asada R., Kogure K. Bioremediation of coastal areas 5 years after the Nakhodka oil spill in the Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria // *Environ. Int.* 2004. V. 30. № 7. P. 911–922.
- Das N., Chandran P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview // *Biotechnol. Res. Int.* 2011. V. 2011. Art. ID 941810. <https://doi.org/10.4061/2011/941810>
- Dashti N., Ali N., Eliyas M. et al. Most hydrocarbonoclastic bacteria in the total environment are diazotrophic, which highlights their value in the bioremediation of hydrocarbon contaminants // *Microbes Environ.* 2015. V. 30. № 1. P. 70–75.
- Evtushenko L.I., Dorofeeva L.V., Krausova V.I. et al. *Okibacterium fritillariae* gen. nov., sp. nov., a novel genus of the family *Microbacteriaceae* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002. V. 52. № 3. P. 987–993.
- Farha A.K., Tr T., Purushothaman A. et al. Phylogenetic diversity and biotechnological potentials of marine bacteria from continental slope of eastern Arabian Sea // *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 2018. V. 16. № 2. P. 253–258.
- García M.T., Gallego V., Ventosa A., Mellado E. *Thalassobacillus devorans* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, phenol-degrading, Gram-positive bacterium // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005. V. 55. P. 1789–1795.
- Gauze G.F., Maksimova T.S., Ollkhovtova O.L. et al. Production of madumycin, an antibacterial antibiotic, by *Actinomadura flava* sp. nov. // *Antibiotiki*. 1974. V. 19. P. 771–775.
- Guan T.-W., Tian L., Li E.-Y. et al. *Gracilibacillus aidingensis* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium isolated from Aiding salt lake // *Arch. Microbiol.* 2017. V. 199. № 9. P. 1277–1281.
- Hara A., Syutsubo K., Harayama S. *Alcanivorax* which prevails in oil-contaminated seawater exhibits broad substrate specificity for alkane degradation // *Environ. Microbiol.* 2003. V. 5. № 9. P. 746–753.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33. P. 1870–1874.
- Lai Q., Yuan J., Shao Z. *Altererythrobacter marinus* sp. nov., isolated from deep seawater // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009. V. 59. № 12. P. 2973–2976.
- Lai Q., Yu Z., Yuan J., Sun F., Shao Z. *Nitratireductor indicus* sp. nov., isolated from deep-sea water // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2011. V. 61. № 2. P. 295–298.
- Lane D.J., Pace B., Olsen G.J. et al. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1985. V. 82. № 20. P. 6955–6959.
- Takahashi Y., Matsumoto A., Morisaki K., Ōmura S. *Patulibacter minatonensis* gen. nov., sp. nov., a novel actinobacterium isolated using an agar medium supplemented with superoxide dismutase, and proposal of *Patulibacteriaceae* fam. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006. V. 56. № 2. P. 401–406.
- Tanaka D., Tanaka S., Yamashiro Y., Nakamura S. Distribution of oil-degrading bacteria in coastal seawater, Toyama Bay, Japan // *Environ. Toxicol.* 2008. V. 23. P. 563–569.
- Wang H.-F., Zhang Y.-G., Li L. et al. *Okibacterium endophyticum* sp. nov., a novel endophytic actinobacterium isolated from roots of *Salsola affinis* C. A. Mey // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2015. V. 107. № 3. P. 835–843.
- Wang W., Zhong R., Shan D., Shao Z. Indigenous oil-degrading bacteria in crude oil-contaminated seawater of the Yellow sea, China // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 98. № 16. P. 7253–7269.
- Zeaiter Z., Marasco R., Booth J.M. et al. Phenomics and genomics reveal adaptation of *Virgibacillus dokdonensis* strain 21D to its origin of isolation, the seawater-brine interface of the Mediterranean Sea deep hypersaline anoxic basin discovery // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. Art. ID 1304. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01304>

Taxonomic Diversity of Culturable Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria in the Sea of Japan

E. A. Bogatyrenko^a, A. V. Kim^{a, b}, T. I. Dunkai^{a, c}, A. L. Ponomareva^d, A. I. Es'kova^{a, d}, M. L. Sidorenko^{a, b}, and A. K. Okulov^d

^aFar Eastern Federal University, Vladivostok 690950, Russia

^bFederal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690022, Russia

^cA.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

^dV.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

A total of 137 strains of mesophilic and psychrotolerant hydrocarbon-oxidizing bacteria have been isolated from three regions of the Sea of Japan exposed to different levels of anthropogenic pollution. The taxonomic affiliation of the culturable bacteria from surface water and bottom sediments, involved in the biodegradation of petroleum hydrocarbons in these regions, has been identified. The isolated microorganisms belong to the phyla Actinobacteria, Firmicutes, and Proteobacteria. The hydrocarbon-oxidizing ability of the bacteria *Okibacterium* sp., *Lechevalieria flava*, *Patulibacter* sp., *P. minatonensis*, *Gracilibacillus massiliensis*, *Thalassobacillus* sp., *Virgibacillus dokdonensis*, *Chryseomicrobium amylolyticum*, *Jeotgalibacillus marinus*, *Moraxella osloensis*, *Idiomarina maritima*, and *I. piscisalsi* has been recorded for the first time. The results obtained extend our knowledge about the potential of biodegradation of pollutants by members of certain taxa in the marine environment.

Keywords: biodiversity, hydrocarbon-oxidizing bacteria, oil, hydrocarbons, Sea of Japan