

СОДЕРЖАНИЕ

Биология моря, том 43, № 5, 2017

Обзор

Токсины группы омега-3 кислоты в гидробионтах морей России: продуценты, распространение, нормативное регулирование.

П. А. Каменева, Т. Ю. Орлова

299

Оригинальные статьи

Математическое моделирование динамики выживаемости самок северного морского котика *Callorhinus ursinus* (Linnaeus, 1758) стада острова Тюлений.

О. Л. Жданова, А. Е. Кузин, Е. Я. Фрисман

310

Динамика численности приморского минтая *Theragra chalcogramma* (Pallas, 1814) (Gadiformes: Gadidae) в Японском море.

А. Н. Вдовин, А. Н. Четырбоцкий, В. В. Нуждин

321

Ранние стадии развития хохлатой камбалы *Samaris cristatus* Gray, 1831 (Pleuronectiformes: Samaridae) из Южно-Китайского моря, идентифицированной с помощью метода ДНК-баркодинга.

А. М. Шадрин, М. В. Холодова, А. В. Семенова

329

Функциональная морфология эритроцитов морского ерша *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 (Scorpaeniformes: Scorpaenidae) в условиях гипоксии.

А. А. Солдатов, Т. А. Кухарева, А. Ю. Андреева, И. А. Парфенова, В. Н. Рычкова, Д. С. Зинькова

335

Ключ для определения зоо роящих креветок инфраотрядов Gebiidea и Axiidea из залива Петра Великого Японского моря.

О. М. Корн, Д. Д. Голубинская, Е. С. Корниенко

341

Таксономический состав, характеристика и нейротоксическая активность микрофлоры, ассоциированной с немертинами из Японского моря.

Д. И. Мельникова, И. А. Беленева, А. П. Тюнин, Т. Ю. Магарламов

349

Ферменты бактериального изолята бурой водоросли *Sargassum polycystum* Agardh, 1824, участвующие в биотрансформации полианионных олиго- и полисахаридов.

Ю. В. Дубровская, В. В. Куриленко, Као Тхи Тхуи Ханг, Буи Минг Ли, И. Ю. Бакунина, Т. Н. Звягинцева, В. В. Михайлов

358

Грибы в донных грунтах Баренцева и Карского морей.

Е. Н. Бубнова, Д. А. Никитин

366

Антиоксидантный потенциал массовых видов макроводорослей Японского моря.

И. М. Яковлева, Е. С. Белоусов

372

CONTENTS

Biologiya Morya, Vol. 43, no. 5, 2017

Simultaneous English language translation of the journal is available from МАИК Наука/Interperiodica Publishing (Russia).

Distributed worldwide by SPRINGER. *Russian Journal of Marine Biology* ISSN 1063-0740.

Index and Abstracts of papers are available at <http://pleiades.online/en/journal/marbio>

English translation of Index and Abstracts of the Russian language edition are available at <http://www.bm.dvo.ru>

Review

Okadaic acid group toxins in hydrobionts of Russian Seas: producers, distribution, safety regulation.

P. A. Kameneva, T. Yu. Orlova

299

Original papers

Mathematical modeling of variation in survival of female northern fur seals, *Callorhinus ursinus* (Linnaeus, 1758), on Tyuleniy Island.

O. L. Zhdanova, A. E. Kuzin, E. Ya. Frisman

310

Dynamics of abundance of the walleye pollock *Theragra chalcogramma* (Pallas, 1814) (Gadiformes: Gadidae) in the Sea of Japan.

A. N. Vdovin, A. N. Chetyrbotsky, V. V. Nuzhdin

321

Early developmental stages of the cockatoo flounder *Samaris cristatus* Gray, 1831 (Pleuronectiformes: Samaridae) from the South China Sea, identified using DNA barcoding.

A. M. Shadrin, M. V. Kholodova, A. V. Semenova

329

Functional morphology of erythrocytes of the black scorpionfish *Scorpaena porcus* (Linnaeus, 1758) (*Scorpaeniformis: Scorpaenidae*) at hypoxia.

A. A. Soldatov, T. A. Kukhareva, A. Yu. Andreeva, I. A. Parfenova, V. N. Rychkova, D. S. Zin'kova

335

A key for the identification of zoeae of burrowing shrimps of the infraorders Gebiidea and Axiidea in Peter the Great Bay, the Sea of Japan.

O. M. Korn, D. D. Golubinskaya, E. S. Kornienko

341

Taxonomic composition, characteristics and neurotoxic activity of ribbon worm-associated bacteria from sea of Japan.

D. I. Melnikova, I. A. Beleneva, A. P. Tyunin, T. Yu. Magarlamov

349

The enzymes of marine bacterial isolate from the brown alga *Sargassum polycystum* Agardh, 1821, catalyzing the transformation of polyanionic oligo- and polysaccharides.

Yu. V. Dubrovskaya, V. V. Kurilenko, Cao Thi Thuy Hang, Bui Minh Ly, I. Yu. Bakunina, T. N. Zvyagintseva, V. V. Mikhailov

358

Fungi in bottom sediments of the Barents and Kara Sea.

E. N. Bubnova, D. A. Nikitin

366

Antioxidant potential of dominant macroalgae species from the Sea of Japan.

I. M. Yakovleva, E. S. Belotsitsenko

372

ТОКСИНЫ ГРУППЫ ОКАДАЕВОЙ КИСЛОТЫ В ГИДРОБИОНТАХ МОРЕЙ РОССИИ: ПРОДУЦЕНТЫ, РАСПРОСТРАНЕНИЕ, НОРМАТИВНОЕ РЕГУЛИРОВАНИЕ*

© 2017 П. А. Каменева^{1,2}, Т. Ю. Орлова¹

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

²Дальневосточный федеральный университет, Владивосток 690091
e-mail: kameneva.p.a@gmail.com; torlova06@mail.ru

Статья принята к печати 30.03.2017 г.

Представлены структура и описан механизм биологического действия токсинов группы окадаевой кислоты (диарейных токсинов моллюсков – ДТМ); дана краткая характеристика методов их идентификации и количественного анализа. Приведены сведения об организмах-продуцентах ДТМ. Рассмотрена проблема диарейного отравления моллюсками, обитающими в морях России. Обсуждаются правовые аспекты регулирования и мониторинга токсинов группы окадаевой кислоты в продуктах питания в разных странах.

Ключевые слова: диарейные токсины моллюсков, окадаевая кислота, *Dinophysis*, *Prorocentrum*, иммуноферментный анализ, высокоэффективная жидкостная хроматография.

Okadaic acid group toxins in hydrobionts of Russian Seas: producers, distribution, safety regulation.
P. A. Kameneva^{1,2}, T. Yu. Orlova¹ (¹A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology, National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041; ²Far Eastern Federal University, Vladivostok 690091)

The structure and mechanism of biological activity of diarrhetic shellfish toxins (DSTs) is presented; the short description of identification and quantitative analysis is given. Information of DSTs producing organism is shown. The problem of diarrhetic poisoning by shellfish, inhabiting the Russian Seas is considered. The legal aspects of safety regulation and monitoring of okadaic acid group toxins in food products in different countries are discussed. (Biologiya Morya, 2017, vol. 43, no. 5, pp. 299–309).

Keywords: diarrhetic shellfish toxins, okadaic acid, *Dinophysis*, *Prorocentrum*, enzyme-linked immunosorbent assay, high-performance liquid chromatography.

Краткая характеристика и разнообразие токсинов группы окадаевой кислоты

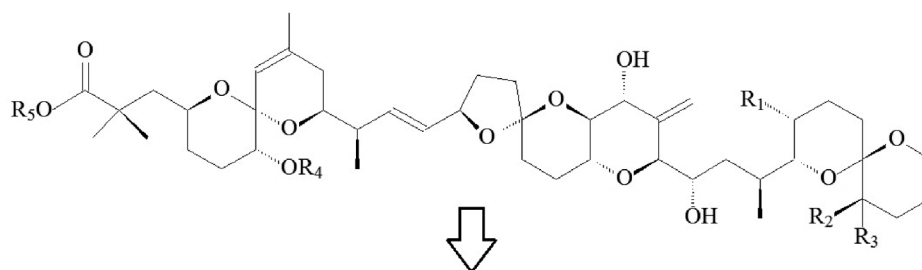
Окадаевая кислота (ОК) и её производные (аналоги ОК) – это низкомолекулярные вторичные метаболиты морских динофитовых микроводорослей родов *Dinophysis* (Reguera et al., 2014) и *Prorocentrum* (Hoppenrath et al., 2013) поликетидной природы, обладающие липофильными свойствами (Yasumoto et al., 1978) (рис. 1). Микроводоросли, являющиеся начальным звеном морских пищевых цепей, способны передавать данные вещества консументам. В периоды массового развития микроводорослей высокие концентрации токсинов могут быть выявлены в тканях моллюсков-фильтраторов: мидий (Mouratiadou et al., 2006; Prassopoulou et al., 2009; Li et al., 2012), устриц (Deeds et al., 2010) и гребешков (Suzuki et al., 2005), а также в тканях таких консументов, как крабы (Torgersen et al., 2008) и морские млекопитающие (Wang et al., 2015).

С биохимической точки зрения аналоги ОК являются специфическими ингибиторами серин/треониновых

фосфатаз (Dawson, Holmes, 1999) – ферментов, выполняющих дефосфорилирование белков в клетках млекопитающих (Dounay, Forsyth, 2002). Разнообразие биологических эффектов, вызываемых аналогами ОК, достаточно велико. Из них наиболее распространенным является диарейный синдром, вызываемый попаданием аналогов ОК в организм человека. В связи с этим данная группа веществ наиболее известна как диарейные токсины моллюсков (ДТМ). Среди менее распространенных эффектов – нарушение структуры нуклеиновых кислот, воздействие на клеточные процессы (рост, деление, поддержание функции клеточного скелета), нейро-, иммуно- и эмбриотоксические эффекты, а также канцерогенная активность (Valdiglesias et al., 2013). В последнее время появляются данные о том, что не все эффекты, вызываемые ОК, могут быть объяснены её воздействием на серин/треониновые фосфатазы (Munday, 2013). Высказано предположение, что токсический механизм аналогов ОК может быть связан также с их нейрональной активностью (Louzao et al., 2015).

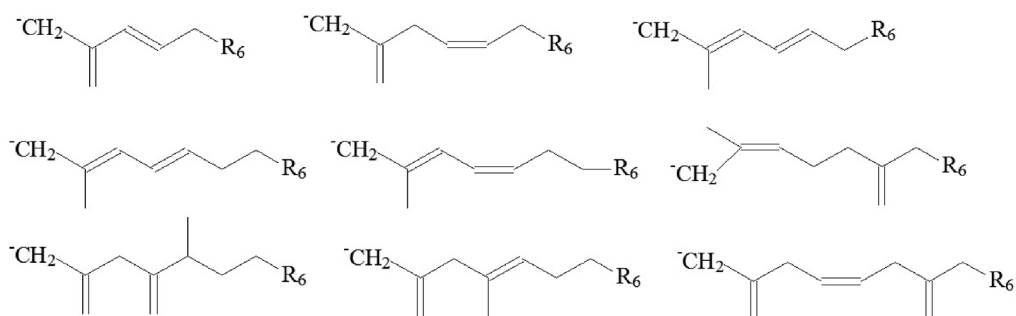
*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ № 14-04-00860 (мониторинг микроводорослей), 15-04-05331 и 16-34-00413 (изучение *Prorocentrum foraminosum* из залива Петра Великого Японского моря) и РНФ № 14-50-00034 (анализ ДТМ в тканях гидробионтов).

Окадаевая кислота, динофизистоксин 1-3



Диольные эфиры

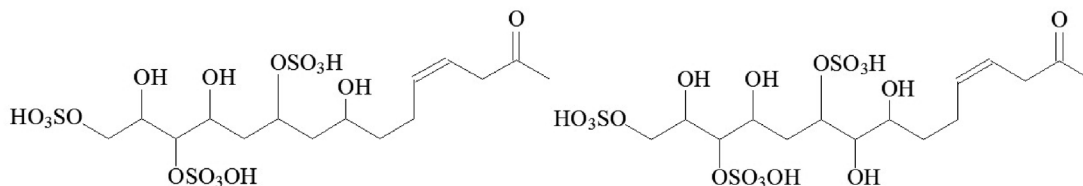
R5 :



R6 = OH

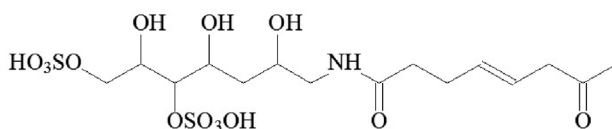
Динофизистоксин-4

R6 :



Динофизистоксин-5

R6 :



Динофизистоксин-6

R6 :

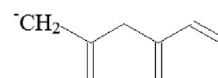


Рис. 1. Структура окадаевой кислоты и ее производных. Окадаевая кислота: $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$; динофизистоксин-1: $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{CH}_3$, $R_3 = \text{H}$; динофизистоксин-2: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{CH}_3$; динофизистоксин-3: $R_4 = \text{жирной кислоты}$ (McNaab, 2008; Hu et al., 2017).

Известно несколько типов производных ОК, основными являются динофизистоксин-1 (ДФТ-1, метил окадаевая кислота) и динофизистоксин-2 (ДФТ-2, изомерная форма окадаевой кислоты), которые иногда называют родительскими токсинами, поскольку от них могут быть образованы конъюгированные формы токсинов (McNabb, 2008). К конъюгированным формам токсинов относятся сложные эфиры родительских токсинов с жирными кислотами, составляющие группу динофизистоксин-3 (рис. 1). Данные токсины образуются в тканях моллю-

сков (Suzuki et al., 1999). К конъюгированным формам относятся также диольные спирты и их сульфатированные производные (динофизистоксины-4-6), которые были обнаружены в клетках микроводорослей (Hu et al., 1995; Suárez-Gómez et al., 2001). Образование конъюгированных форм токсинов, по-видимому, является механизмом защиты организмов-продуцентов и моллюсков-фильтраторов от их токсического действия (Cembella, 2003). В молекуле ОК имеются две важные для связывания с ферментами функциональные группы – терминальная

карбоксильная группа и гидроксильная группа у седьмого атома углерода (McNabb, 2008). При исследовании кристаллической структуры ОК с ферментом было показано, что ОК образует вторичную циклическую структуру, в которой функциональные группы связаны посредством водородных связей (Tachibana et al., 1981). При модификации данных групп, по-видимому, нарушается их взаимодействие, вследствие этого снижается сродство молекул токсинов с серин/треониновыми фосфатазами. Например, показано, что динофизистоксин-3 в 3000 раз менее эффективно связывается с ферментом PP2A, чем его свободные аналоги (McNabb, 2008). Следовательно, по функциональным свойствам аналоги ОК можно разделить на две группы: активные формы токсинов, которые имеют высокое сродство к серин/треониновым фосфатазам и оказывают ингибирующее действие в малых концентрациях, и неактивные формы токсинов, не обладающие подобными свойствами (McNabb, 2008).

Характеристика основных продуцентов токсинов группы ОК и их распространение в морях России

Диарейные токсины моллюсков были обнаружены в клетках динофлагеллят родов *Dinophysis* и *Prorocentrum*, которые широко распространены в борельных, тропических и субтропических районах Мирового океана (Hoppenrath et al., 2013; Reguera et al., 2014). Род *Dinophysis* насчитывает около 150 видов, обитающих в прибрежных водах Мирового океана (Reguera et al., 2014). До того, как было доказано, что *D. fortii* является потенциальным возбудителем диарейного отравления, виды рода *Dinophysis* не принимались во внимание при поиске организмов, вызывающих данный синдром (Yasumoto et al., 1985). Это связано с тем, что представители рода *Dinophysis* редко достигают высокой численности и не могут быть причиной так называемого вредоносного цветения, сопровождающегося изменением цвета воды. Однако даже при концентрации 100–500 кл/л, что составляет 1–5% от всего сообщества микроводорослей, в тканях моллюсков-фильтраторов могут накапливаться значительные концентрации токсинов (Reguera, Pizarro, 2008). В периоды массового развития клетки *Dinophysis* образуют скопления у поверхности воды с численностью до нескольких сотен тысяч клеток в одном литре (Farrell et al., 2012). Установлено, что некоторые виды рода *Dinophysis* продуцируют два типа липофильных токсинов: ОК и её производные, а также пектентоксины, которые ранее относили к группе ДТМ, но в настоящее время выделяют в отдельную группу токсинов (McNabb, 2008). Способность продуцировать ДТМ подтверждена для 11 видов рода *Dinophysis*: *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. caudata*, *D. fortii*, *D. infundibulum*, *D. miles*, *D. norvegica*, *D. sacculus*, *D. ovum*, *D. tripos* и *D. rotundata* (= *Phalacroma rotundatum*) (см.: Reguera et al., 2012). Сведения о способности данных видов продуцировать токсины были получены при исследовании преимущественно природного материала (Reguera et al., 2012),

поскольку введение этих видов в культуру было затруднено до 2006 г. (Park et al., 2006).

Род *Prorocentrum* насчитывает около 60 видов, обитающих в океанических и прибрежных водах Мирового океана, из которых 29 видов являются эпифитными или бентосными, остальные виды представлены планктонными формами (Hoppenrath et al., 2013). У 10 видов этого рода выявлена способность синтезировать различные токсины; для шести из них отмечены случаи продуцирования ОК и ДФТ, это *P. lima*, *P. belizeanum*, *P. hoffmannianum*, *P. concavum*, *P. rhathymum* и *P. foraminosum* (см.: Hoppenrath et al., 2013; Kameneva et al., 2015a). Одним из наиболее распространённых в мире видов рода *Prorocentrum*, ассоциированных с ДТМ, является вид *P. lima*, который обитает как в тропических, так и в умеренных широтах.

Из всех известных продуцентов ДТМ в морях России встречаются 12 видов: 10 видов рода *Dinophysis* и два вида рода *Prorocentrum* (*P. lima*, *P. foraminosum*) (рис. 2, табл. 1). *D. acuminata* – наиболее часто встречающийся вид, который не был обнаружен только в море Лаптевых и для которого зарегистрирована рекордная численность среди всех продуцентов ДТМ в России (Kononova, 1993). Это типичный представитель фитопланктона прибрежной зоны дальневосточных морей России. Широко распространёнными видами являются *D. acuta* и *D. norvegica*, обнаруженные в большинстве морей России, однако их численность по сравнению с таковой *D. acuminata* на несколько порядков ниже. Вид *D. norvegica* может быть доминирующим по численности среди других видов рода *Dinophysis* на акватории Баренцева и Белого морей; в последнем случае накопление ДТМ связывают с присутствием этого вида (Вершинин, Орлова, 2008). *D. fortii* относится к видам, обитающим в умеренном климате, поэтому не отмечен в морях Северного Ледовитого океана. В дальневосточных морях России численность *D. fortii* в августе может достигать высоких значений (Orlova, 2013). Тропический вид *D. caudata* встречается в Японском море в зоне действия Цусимского течения (Конвалова, 1998) и в Чёрном море, где является обычным представителем фитопланктона (Morton et al., 2009). Наряду с *D. acuminata* и *D. fortii* этот вид способен передавать токсины двусторчатым моллюскам; при массовом развитии *D. caudata* отмечены случаи отравления морепродуктами (Вершинин, Орлова, 2008).

Распространение представителей рода *Prorocentrum*, известных как продуценты ДТМ, ограничено акваториями Чёрного, Баренцева, Белого, Каспийского и Японского морей. Известны также находки *P. lima* (как *Exuviaella marina* var. *lima*) в Каспийском и Аральском морях (Киселев, 1950). Массовое развитие *P. lima* в Чёрном море связывают с накоплением ДТМ моллюсками (Morton et al., 2009). Присутствие *P. foraminosum* было подтверждено на молекулярно-генетическом уровне только для акватории Японского моря. Для этого вида впервые была показана способность продуцировать ДФТ-1 в условиях лабораторного культивирования (Kameneva et al., 2016).

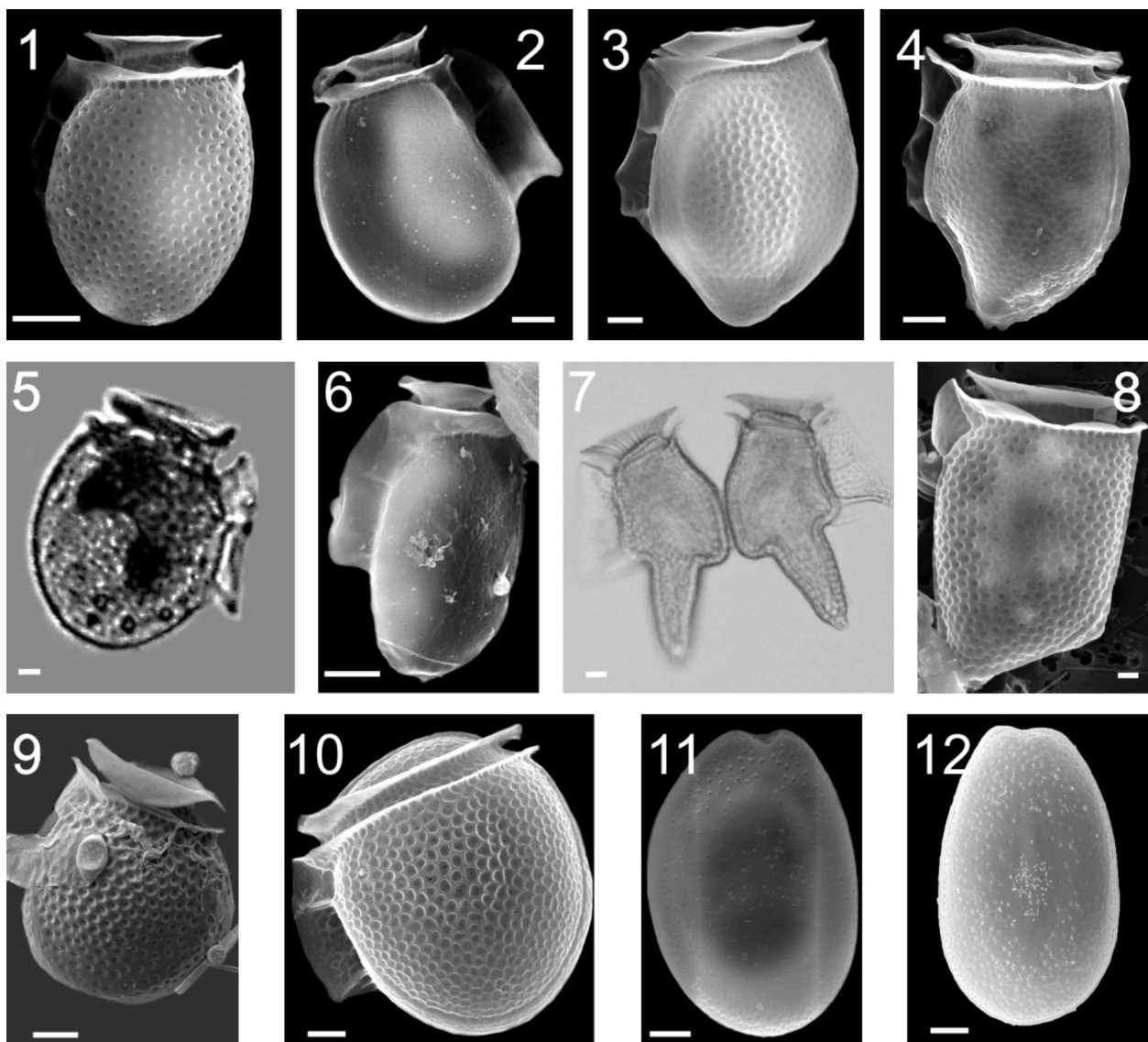


Рис. 2. Представители родов *Dinophysis* и *Prorocentrum* из морей России, известные как продуценты ДТМ. 1 – *Dinophysis acuminata*, 2 – *D. fortii*, 3 – *D. acuta*, 4 – *D. norvegica*, 5 – *D. ovum*, 6 – *D. sacculus*, 7 – *D. tripos*, 8 – *D. caudata*, 9 – *D. infundibulum*, 10 – *D. rotundata*, 11 – *Prorocentrum lima*, 12 – *P. foraminosum*. Масштаб – 5 мкм.

Динамика численности наиболее часто встречающихся видов родов *Dinophysis* и *Prorocentrum* характеризуется ярко выраженной сезонной и многолетней изменчивостью. На акваториях российского побережья Японского моря в теплое время года по численности преобладают *D. acuminata* и *D. fortii*. Анализ многолетней сезонной динамики фитопланктона в зал. Петра Великого Японского моря показал, что по биомассе виды рода *Dinophysis* доминировали среди остальных планктонных микроводорослей в мае и июне (Алексанин и др., 2012). Средняя суммарная численность микроводорослей рода *Dinophysis* в летнее время варьировала в пределах 150–3000 кл/л, а в зимнее время – 10–200 кл/л. На акватории Чёрного моря *D. acuminata* встречался в течение всего года со средней численностью 150–300 кл/л; предполагается, что в период с апреля по сентябрь его численность

увеличивается (Morton et al., 2009). Клетки *P. lima* могут быть найдены в образцах фитопланктона, отобранных после сильных штормов. На акватории Чёрного моря максимальная численность этого вида в планктоне достигала 350 кл/л (Morton et al., 2009).

Для более подробного изучения численности эпифитных видов необходимо оценивать плотность их поселения на макрофитах, выражаемую в количестве клеток на 1 г сухой массы макрофита. Такая работа была проведена для акватории Японского моря, где вид *P. lima* характеризуется как малочисленный. Данный вид редко достигает плотности более 100 кл/г сухой массы макрофита, однако в июне 2013 и 2014 гг. отмечено повышение плотности этого вида до 1000 кл/г сухой массы макрофита (Селина, 2017). Интересно, что в желудках мидии были обнаружены клетки *P. lima* в период их отсутствия в план-

Таблица 1. Встречаемость и максимальная плотность клеток продуцентов (тыс. кл/л) ДТМ в морях России

Вид	Балтийское	Чёрное	Азовское	Баренцево	Белое	Карское	Лаптевых	Восточно-Сибирское	Чукотское	Кроноцкий залив	Охотское	Японское	Авачинский залив
<i>Dinophysis acuminata</i>	(3)	(3)	200(1)	(2)	(2)	(2)	–	(2)	(2)	–	4(10)	200(9)	500(4)
<i>D. fortii</i>	–	(3)	(3)	–	–	–	–	–	(2)	–	0.2(10)	10(12)	–
<i>D. acuta</i>	–	(3)	–	(2)	(2)	(2)	(2)	–	(2)	(14, 16)	3(10)	1(12)	3.8(11)
<i>D. norvegica</i>	–	1.6(6)	–	(2)	(2)	(2)	(2)	(2)	(2)	(14)	(13)	5(4)	7.4(8)
<i>D. ovum</i>	(3)	(3)	(3)	(2)	(2)	–	–	–	–	(16)	–	0.1(4)	–
<i>D. sacculus</i>	–	(3)	(3)	–	–	–	–	–	–	–	–	1(12)	–
<i>D. tripos</i>	–	(3)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	(4)	–
<i>D. caudata</i>	–	3(5)	(3)	–	–	–	–	–	–	–	–	0.1(4)	–
<i>D. infundibulum</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	(13)	0.1(4)	–
<i>D. rotundata</i>	–	3(5)	–	(2)	(2)	(2)	–	–	(2)	(14, 16)	1(10)	0.1(12)	(8)
<i>Prorocentrum lima</i>	–	3.2(5)	–	(2)	(2)	–	–	–	–	–	–	1(15)	–
<i>P. foraminosum</i> *	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1.5(7)	–

*Эпифитный вид.

Примечание. Цифра перед скобками – максимальная плотность клеток, в скобках – источник данных (максимальная плотность неизвестна); "–" – вид не обнаружен. Источник данных: 1 – Вершинин, Орлова, 2008; 2 – Okolodkov, 2005; 3 – Рябушко, 2003; 4 – Orlova, 2013; 5 – Morton et al., 2009; 6 – Verzhinin et al., 2006; 7 – Селина, 2017; 8 – Коновалова, 1998; 9 – Kameneva, Orlova, 2015; 10 – Орлова и др., 2007; 11 – Konovalova, 1993; 12 – Орлова и др., 2009; 13 – Орлова и др., 2004; 14 – Кузьмина, 1962; 15 – Selina, Levchenko, 2011; 16 – Семина, 1959.

ктоне. Авторы исследования объясняют данный факт тем, что *P. lima* ассоциирован с макрофитами-обрастателями раковин моллюсков (Morton et al., 2009).

Содержание ДТМ в природных популяциях микроводорослей было подтверждено только для *D. acuminata* из Японского моря (Orlova et al., 2015). Для исследования использовали фильтры с образцами фитопланктона, в которых при помощи световой микроскопии были выявлены клетки *D. acuminata*. В этих образцах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (ВЭЖХ–МС) были обнаружены ОК и пектентоксин-2, концентрация которых в среднем составляла 3.9 и 30.8 пг/кл соответственно (Orlova et al., 2015). Для всех других видов микроводорослей продукция токсинов установлена опосредованно по их обнаружению в моллюсках в период массового развития этих микроводорослей или в культурах клеток (Verzhinin et al., 2006; Morton et al., 2009). Наиболее изученными в отношении продуцентов ДТМ районами в России являются дальневосточные моря и Чёрное море. Для иных акваторий собрано недостаточно данных о сезонных и многолетних изменениях состава фитопланктона, чтобы уверенно исключить возможность присутствия других продуцентов.

Накопление токсинов в тканях двустворчатых моллюсков и сезонность этого процесса

Диарейные токсины моллюсков обладают свойством биоаккумуляции и передаются по пищевым цепям. Среди гидробионтов, в мягких тканях которых наиболее часто присутствуют ДТМ, двустворчатые моллюски и рыбы, питающиеся фитопланктоном (Valdiglesias et

al., 2013). В последнее время появились сообщения об обнаружении токсинов в мягких тканях ракообразных (Torgersen et al., 2008) и морских млекопитающих (Wang et al., 2015). Для оценки рисков отравления людей в России было проведено несколько исследований накопления ДТМ в промысловых видах моллюсков и в видах, являющихся объектами любительского лова (табл. 2). Несмотря на то, что исследования были проведены с применением разных аналитических методов, во всех случаях выявлены концентрации ДТМ, приближающиеся или в несколько раз превышающие ПДК (160 мкг/кг). Наибольшая концентрация токсинов выявлена в пищеварительной железе мидии *Crenomytilus grayanus* из зал. Петра Великого Японского моря – суммарно около 1400 мкг/кг, что в 8.75 раза превышает ПДК (Каменева и др., 2016). В тканях мидии *Mytilus edulis* из Кандакшского залива Белого моря концентрация токсинов составляла 127.8 мкг/кг (Verzhinin et al., 2006). Отметим, что качественный состав токсинов в этих случаях различался. Так, у *M. edulis* и *C. grayanus* содержание ОК составляло 15 и 33%, а ДФТ-1 и ДФТ-2 – 85 и 67% соответственно (табл. 2). Вероятно, качественный состав токсинов может зависеть от профиля токсинов у продуцентов, который в этих двух случаях различался.

При сравнении содержания токсинов в тканях разных видов морских двустворчатых моллюсков (мидия *M. edulis*, гребешки *Mizuhopecten yessoensis* и *Chlamys nipponensis*, устрицы *Crassostrea gigas* и *Ostrea edulis*) были выявлены межвидовые особенности в накоплении токсинов (Yasumoto et al., 1978). Самой высокой концентрация токсинов была в тканях мидий и ниже – в тканях устриц и гребешков. Анализ распределения токсинов

Таблица 2. Случаи обнаружения ДТМ в двустворчатых моллюсках, обитающих в морях России

Вид	Концентрация ДТМ, мкг/кг	Метод	Возможный источник ДТМ	Район	Источник данных
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Присутствие	PP2A	<i>Dinophysis caudata</i>	Чёрное море	Вершинин, Орлова, 2008
<i>M. galloprovincialis</i>	254 (общая)	PP2A	<i>Prorocentrum lima</i>	Чёрное море (б. Утриш)	Вершинин, Орлова, 2008
<i>M. edulis</i>	20 (ОК), 110 (ДФТ-1)	ВЭЖХ-МС	<i>Dinophysis acuminata</i> <i>D. norvegica</i>	Белое море (Кандалакшский залив)	Vershinin et al., 2006
<i>Patinopecten yessoensis</i>	>160 (общая)	ИФА	<i>D. rotundata</i>	Охотское море (зал. Анива)	Могильникова и др., 2007
<i>Crenomytilus grayanus</i>	472 (ОК), 919 (ДФТ-2)	ВЭЖХ-ФД	<i>D. acuminata</i> <i>D. acuta</i> <i>D. fortii</i>	Японское море (зал. Петра Великого)	Каменева и др., 2016
<i>Mytilus trossulus</i>	238 (общая)	ИФА	<i>D. acuminata</i>	Японское море (зал. Восток)	Orlova et al., 2015

в органах гидробионтов показал, что у мидий содержание аналогов ОК было наибольшим в пищеварительной железе, следующим органом по содержанию токсинов были жабры. У гребешков и устриц значительная концентрация токсинов была обнаружена только в пищеварительной железе (Yasumoto et al., 1978). Известно, что в пищеварительной железе *Mytilus galloprovincialis* аккумулируется до 100% ДТМ, а *M. edulis* – до 50%. У многих моллюсков рода *Pecten* значительное количество токсинов накапливается вне пищеварительной железы. В эксперименте при удалении пищеварительной железы из анализируемых тканей гребешка *Pecten fumatus* общее содержание токсинов снизилось лишь на 22%. У гребешка *Argopecten irradians* до 23% липофильных токсинов накапливалось вне пищеварительной железы (Bauder et al., 2001).

Содержание токсинов в тканях моллюсков, очевидно, зависит от их рациона и биотопа. Так, в питании *M. galloprovincialis* большую часть составляют динофлагелляты, тогда как количество диатомовых водорослей незначительно. Вероятно, более высокое содержание ДТМ в тканях *M. galloprovincialis*, чем в тканях других мидий, обитающих в этой же акватории, связано с пищевой избирательностью данного вида (Reizopoulou et al., 2008). Моллюски, обитающие на песчаных грунтах, могут накапливать ДТМ посредством фильтрации как живых, так и погибших, но неразрушенных клеток микроводорослей. Например, особи *Modiolus barbatus*, обитавшие в мягком грунте, содержали более высокие концентрации ДТМ, чем особи *M. galloprovincialis*, прикрепившиеся к камням (Reizopoulou et al., 2008).

У разных видов моллюсков содержание свободной ОК и её производных в тканях существенно различается. Показано, что в пищеварительной железе *C. grayanus* концентрация аналогов ОК была значительно выше, чем в окружающих тканях, а доля конъюгированных форм токсинов среди аналогов ОК не превышала 40%. Вклад ДФТ-3 из пищеварительной железы в общее количество ДФТ-3 составлял менее 3% (при учёте соотношения массы пищеварительной железы и массы всех тканей).

В съедобных тканях мидий суммарная концентрация аналогов ОК была ниже, чем в пищеварительной железе, но более 82% токсинов находилось в форме неактивного ДФТ-3 (Kameneva et al., 2015b). В мидиях с тихоокеанского побережья США конъюгированные формы токсинов не обнаружены (Trainer et al., 2013). Однако такие моллюски, как устрицы и гребешки, содержали до 90% ДТМ в форме неактивных производных ОК (McNabb, Holland, 2002). У *M. galloprovincialis* из прибрежных вод Испании и у *M. edulis* из прибрежных вод Франции ОК и её аналоги, включая ДФТ-3, содержались преимущественно в пищеварительной железе, а в окружающих мягких тканях обнаружено не более 6.2% всех токсинов (Blanco et al., 2007; Marcaillou et al., 2010). В то же время в тканях гребешка *A. irradians*, собранного у побережья Канады, 76% аналогов ОК содержалось в пищеварительной железе, 12% – в гонадах и около 12% – в жабрах, мантии и мускуле-замыкателе (Bauder et al., 2001). В съедобных тканях австралийского двустворчатого моллюска *P. fumatus* содержалось только 34% аналогов ОК (Madigan et al., 2006). У *Cerastoderma edule* из прибрежных вод Португалии больше 95% аналогов ОК в съедобной части (без пищеварительной железы) содержалось в форме сложных эфиров (Vale et al., 1999).

Существует мнение, что качественный и количественный состав токсинов в разных органах двустворчатых моллюсков изменяется в процессе накопления, трансформации и элиминации токсинов. Высокий уровень аналогов ОК в пищеварительной железе животных поддерживается за счёт высокого уровня токсинов в микроводорослях, непрерывно поступающих с пищей. Активные формы токсинов могут превращаться в неактивную липофильную форму непосредственно в пищеварительной железе (Suzuki et al., 1999; Vale, Samprayo, 2002). После ацилирования возможны либо расщепление ДФТ-3 в пищеварительной железе с помощью собственных пищеварительных ферментов (MacKenzie et al., 2012), либо перенос ДФТ-3 в окружающие ткани (Blanco et al., 1999). В обоих случаях, вероятно, происходят процессы деток-

сикации и элиминации данных веществ из тела моллюска при питании микроводорослями, не продуцирующими токсины (Svensson, 2003; Marcaillou et al., 2010). Тем не менее, при высокой скорости поступления токсинов в организм мидии процессы детоксикации, по-видимому, достигают предела, что приводит к смещению равновесия в пользу временного накопления токсинов в форме ДФТ-3 вне пищеварительной железы. Результатом такого накопления может быть биоаккумуляция токсинов. При сезонном уменьшении количества токсических микроводорослей в фитопланктоне процесс образования ДФТ-3 останавливается. Эта форма токсина, по-видимому, удаляется из организма моллюска. Данное предположение подтверждают результаты эксперимента: при кормлении моллюсков, содержащих высокие концентрации ДТМ, набором микроводорослей, неспособных продуцировать ДТМ, концентрация токсинов в моллюсках быстро снижалась (Svensson, 2003; Marcaillou et al., 2010).

В сезонном аспекте у моллюсков отмечены периоды повышенного и пониженного содержания токсинов в тканях. Так, у обитателей зал. Петра Великого Японского моря концентрация токсинов повышалась с марта по октябрь, её максимум отмечен в мае (Каменева и др., 2016). В Чёрном море концентрация ДТМ в пищеварительной железе мидий повышалась на один порядок в июле–августе, что соответствовало максимальной численности потенциальных продуцентов (Morton et al., 2009). Сезонные изменения в профиле токсинов в тканях гидробионтов связаны с динамикой состава фитопланктона. В зимние месяцы в зал. Петра Великого отмечено значительное снижение численности основных продуцентов ДТМ (Орлова и др., 2009). В это время концентрация токсинов в пищеварительной железе мидии *C. grayanus* была самой низкой. Наиболее разнообразным состав потенциальных продуцентов был в летние месяцы, когда наблюдалось и наибольшее разнообразие качественного состава токсинов.

В организм человека токсины попадают при употреблении в пищу морепродуктов, содержащих эти токсины. В двусторчатых моллюсках токсины могут присутствовать в двух основных формах: как свободные активные токсины и как ДФТ-3. В тканях моллюсков ДТМ в основном находятся в форме ДФТ-3, поэтому в организм человека токсин попадает в этой форме. Под действием пищеварительных ферментов происходит расщепление ДФТ-3 на остаток жирной кислоты и свободный родительский токсин. Возможно, поэтому первые симптомы отравления наблюдаются через 30–240 мин после приёма пищи (McNabb, 2008).

Особенности анализа токсинов группы окадаевой кислоты

При исследовании качественного и количественного состава токсинов группы ОК в разных биологических объектах используют две группы методов: методы биологического тестирования (непрямые методы анализа)

и аналитические инструментальные методы (прямые методы анализа). Биотесты позволяют определить общее содержание токсинов в пробе. Они включают методы с использованием живых организмов, например мышей, а также *in vitro* методы на основе взаимодействия рецептор-лиганд и иммунологических тестов. К аналитическим методам относят ВЭЖХ с использованием различных детекторов (Anderson, 2001). Тестирование с использованием живых организмов долгое время считалось основным способом выявления опасных веществ в продуктах питания. Однако от данных методов было решено отказаться в пользу аналитических методов из-за этических вопросов, сложностей с гармонизацией и из-за большого влияния неспецифических реакций. Отметим, что в некоторых странах к рекомендованным методам продолжают относить биотестирование на мышах, поскольку данный метод гарантирует выявление неизвестных ранее токсичных веществ (Rodríguez-Velasco, 2008).

Опосредованные методы анализа. В основе метода конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) токсинов лежит принцип взаимодействия между антителами (АТ) и антигенами, где в качестве антигена выступает ОК. Для анализа также необходим раствор, содержащий конъюгат ОК с ферментом пероксидазой. При взаимодействии антител с ОК из исследуемого экстракта и конъюгатом ОК с ферментом пероксидазой происходит конкурентное связывание свободных молекул ОК и конъюгированных с ферментом молекул ОК с АТ. Концентрацию аналогов ОК определяют, измеряя концентрацию окрашенных продуктов реакции пероксидазы. При высокой концентрации ОК в пробе концентрация конъюгированного фермента низкая, что снижает интенсивность окраски. Несмотря на высокую чувствительность данного метода, он обладает рядом недостатков. Во-первых, имеет перекрестную чувствительность к ДФТ-1 и ДФТ-2 на уровне 50%, поэтому считается полуколичественным, поскольку не позволяет определить точное соотношение между содержанием ОК и её производных. Во-вторых, данный метод не позволяет выявлять ДФТ-3 без проведения дополнительного этапа щелочного гидролиза. В то же время этот метод позволяет определять суммарное содержание токсинов в пробах с большей точностью, чем биологическое тестирование на мышах.

Поскольку ДТМ являются специфическими ингибиторами серин/треониновых фосфатаз, данное свойство можно использовать для чувствительного определения и идентификации токсинов. В целом методика похожа на конкурентный иммуноферментный анализ и обладает схожей специфичностью. Этот метод также не позволяет дифференцировать разные свободные токсины и не выявляет ДФТ-3.

Прямые методы анализа. С развитием таких методов анализа, как ВЭЖХ, применение ИФА стало нерациональным из-за высокой стоимости и высоких рисков получения недостоверных результатов. Приемлемый ре-

зультат разделения токсинов, выделенных из биологических проб, был описан при использовании колонок для обращенно-фазовой хроматографии, в которых в качестве неподвижной фазы используется силикагель с пришитыми C18 группами, а в качестве элюента – смесь ацетонитрила с водой в разных соотношениях, иногда с добавлением трифторуксусной или уксусной кислот (Suzuki, Quilliam, 2011).

Для выявления ДТМ чаще всего применяют один из двух типов детекторов: флуоресцентный (ФД) или масс-спектрометрический (МС) (Suzuki, Quilliam, 2011). При использовании хроматографов с флуоресцентным детектором необходимо проводить модификацию ДТМ флуоресцентными метками, поскольку сами ДТМ не обладают флуоресценцией. В качестве флуоресцентных меток используются 9-антрилдиазометан (АДМ) (Louppis et al., 2010), 1-бромацетилпурен (БАП) (Prassopoulou et al., 2009), различные производные кумарина (Magr et al., 1994) и некоторые другие вещества (James et al., 2000). Для полной дериватизации ДТМ в их флуоресцентные аналоги в реакцию добавляют избыток соответствующей флуоресцентной метки и при необходимости катализатор реакции. Поскольку данные компоненты могут препятствовать эффективному анализу ВЭЖХ-ФД, обязательным этапом подготовки проб после реакции является очистка продуктов с помощью твердофазной экстракции (ТФЭ). ТФЭ проводится на картриджах с немодифицированным силикагелем (James et al., 2000). При проведении дериватизации и очистки продуктов реакции для количественного анализа необходимо учитывать потери, которые могут происходить на каждом из этих этапов. Одним из наиболее надежных способов учёта неконтролируемых потерь во время подготовки проб к анализу является метод внутреннего стандарта, в качестве которого при анализе ДТМ можно использовать дезоксихолиевую кислоту (ДХК) (Stabell et al., 1991). Несмотря на значительные отличия в структуре вещества, ДХК и основные токсины группы ДТМ обладают схожими хроматографическими свойствами.

Таким образом, ВЭЖХ-ФД является точным методом, позволяющим определять индивидуальные токсины группы ОК в виде их флуоресцентных аналогов. Недостатки этого метода – необходимость приобретения реагентов для дериватизации и внутреннего стандарта, а также существенные трудо- и времязатраты при проведении дериватизации и очищении полученных продуктов для анализа. ВЭЖХ-МС является высокоточным методом, позволяющим идентифицировать и количественно анализировать производные ОК. Данный метод применяют при поиске новых аналогов ОК (в этом случае чаще всего используют времяпролетные масс-спектрометры) и при количественном определении (принято использовать масс-спектрометры с трёхквadrupольным масс-анализатором) (Suzuki, Quilliam, 2011). Преимущество ВЭЖХ-МС – возможность обнаружить все аналоги ОК

без предварительной модификации, при этом значительно сокращается время анализа и увеличивается спектр контролируемых веществ.

При сравнении методов непрямого и прямого анализа на образцах, содержащих в основном ОК, наблюдают хорошее совпадение результатов (Prassopoulou et al., 2009). Однако, если в исследуемых пробах преобладают ДФТ-1 и/или ДФТ-2, то непрямые методы анализа могут приводить к получению ложных результатов. При сравнении данных о содержании ДТМ в образцах пищеварительной железы моллюсков из зал. Петра Великого, полученных с помощью ИФА, ингибирования протеинфосфатазы 2 (PP2A) и ВЭЖХ-МС, было установлено, что ИФА и ингибирование PP2A дают соответственно 42 и 30% ложных результатов. Доминирующим токсином был ДФТ-1 (Orlova et al., 2015). Причем среди ложных результатов были как ложноположительные, так и ложноотрицательные. Получение ложноотрицательных результатов можно объяснить различным сродством основных аналогов ОК к антителам (АТ) и PP2A. Сложнее объяснить присутствие ложноположительных результатов, которые, скорее всего, вызваны матричным эффектом и неспецифическим связыванием компонентов экстрактов с АТ и PP2A (Orlova et al., 2015). Подобные результаты получены при анализе мидий, собранных в штате Вашингтон, США (Eberhart et al., 2013).

Правовые аспекты регулирования мониторинга токсинов группы ОК в продуктах питания

Отравление человека ДТМ происходит в основном после употребления в пищу морепродуктов. Поскольку моллюски, содержащие ДТМ, могут нанести вред здоровью человека, хозяйства марикультуры вынуждены вести непрерывный мониторинг содержания опасных веществ в их продукции. Наименьший наблюдаемый уровень неблагоприятного воздействия (ННУНВ) ДТМ на организм человека – 50 мкг (Anonymos, 2008). Интоксикация организма обычно проявляется через несколько часов после употребления морепродуктов, содержащих ДТМ. Госпитализации, как правило, не требуется, и острые симптомы отравления проходят через три дня. Возможное лечение сводится к заместительной терапии для восстановления недостатка воды и электролитов в организме. К настоящему времени ни одного специального противоядия не найдено. Летальные случаи при отравлении ДТМ не зарегистрированы (Tubaro et al., 2008). Предполагают, что длительное употребление в пищу продуктов, содержащих ДТМ, может повышать риск возникновения онкологических патологий органов желудочно-кишечного тракта (Trainer et al., 2013).

Первый случай отравления людей после употребления в пищу морепродуктов, содержащих ДТМ, был отмечен в Нидерландах в 1960 г. (Tubaro et al., 2008; Valdiglesias et al., 2013). Впоследствии отравление людей ОК произошло в 1976 и 1977 гг. в Японии (Yasumoto et al., 1978). С 1976 по 1982 г. около 1300 случаев диарейно-

го отравления моллюсками зарегистрировано в Японии, более 5000 случаев – в Испании и более 3300 случаев – во Франции. В 1984 г. широкое распространение ДТМ в Швеции привело к закрытию хозяйств марикультуры, специализировавшихся на выращивании мидий (Trainer et al., 2013). В последующие 30 лет наличие ОК в тканях моллюсков регистрировали во многих странах мира, включая страны Европы, Северной и Южной Америки, Австралии и Океании (Dominguez et al., 2010). Эти случаи связывают с массовым развитием микроводорослей *Dinophysis* и *Prorocentrum*.

Отравление ДТМ является сложно диагностируемым ввиду того, что причиной отравлений часто бывают скоропортящиеся морепродукты. Для подтверждения отравления ДТМ необходимо располагать образцами морепродуктов, вызвавшими отравление, для анализа на присутствие токсинов. Методики, позволяющие определить отравление ДТМ по анализу выделений человека, не разработаны. Однако в США и Канаде в последние пять лет были зарегистрированы подтвержденные случаи отравлений ДТМ. Высокая озабоченность попаданием токсичных веществ в морепродукты, производимые для широкого потребления, вызвала необходимость разработки норм регулирования и мониторинга ДТМ в тканях гидробионтов, используемых для питания человека. По результатам работы Европейского Парламента и Совета от 29 апреля 2004 г. были установлены особые гигиенические правила для пищевой продукции животного происхождения, включая продукты морского промысла. В частности, "...моллюски ... не должны содержать ДТМ в совокупной концентрации, превышающей 160 мкг в эквиваленте ОК на 1 кг продукта" (Anonymos, 2004). В качестве методов контроля предлагается использовать биотестирование на мышах в комбинации с ВЭЖХ-МС (Anonymos, 2011). Подобные требования утверждены для США, Чили и Новой Зеландии. В Канаде и Австралии ПДК суммарной концентрации ОК и её аналогов составляет 200 мкг/кг при использовании этих же методов (Rodríguez-Velasco, 2008).

Допустимая концентрация токсинов в России при импорте моллюсков не должна превышать 160 мкг/кг мягких тканей. В продуктах, используемых для питания детей, а также в полуфабрикатах из рыбы и нерыбных продуктов наличие ДТМ не допускается; безопасность кулинарных изделий из этих продуктов должна обеспечиваться контролем сырья (Главный государственный санитарный врач РФ, 2008). Методом, применяемым в России для контроля ДТМ, является ИФА (Роспотребнадзор, 2007). Таким образом, в настоящее время в странах, население которых активно использует в пищу морепродукты, введены нормативы содержания ДТМ в продукции и внедрены методы анализа и мониторинга ДТМ. В России введены меры контроля за содержанием ДТМ в продуктах питания (Главный государственный санитарный врач РФ, 2008). Величина ПДК согласуется с таковой в странах ЕС и США (Anonymos, 2011).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алексанин А., Ким В., Орлова Т.Ю. и др. Фитопланктон залива Петра Великого и задача его дистанционного зондирования // *Океанология*. 2012. Т. 52, № 2. С. 1–12.
- Вершинин А.О., Орлова Т.Ю. Токсичные и вредные водоросли в прибрежных водах России // *Океанология*. 2008. Т. 48, № 4. С. 568–582.
- Главный государственный санитарный врач РФ. Об утверждении СанПиН 2.3.2.2401-08 Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы // *Постановление* № 43. 16 июля 2008.
- Каменева П.А., Орлова Т.Ю., Имбс А.Б. Исследование сезонной динамики диарейных токсинов моллюсков в пищеварительной железе мидии *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуоресцентной детекцией // *Биол. моря*. 2016. Т. 42, № 3. С. 224–230.
- Киселев И.А. Панцирные жгутиконосцы. Л.: Изд-во АН СССР. 1950. 230 с.
- Коновалова Г.В. Динофлагелляты (Dinophyta) дальневосточных морей России и сопредельных акваторий Тихого океана. Владивосток: Дальнаука. 1998. 300 с.
- Кузьмина А.И. Фитопланктон Курильских проливов как показатель различных водных масс // *Исслед. дальневост. морей СССР*. 1962. Т. 8. С. 6–90.
- Могильникова Т.А., Мотылькова И.В., Коновалова Н.В. О развитии массовых токсичных видов фитопланктона и содержании фикотоксинов в тканях гребешка *Mizuhopecten yessoensis* (Jay) в прибрежных водах о. Сахалин // *Тр. СахНИРО*. 2007. Т. 9. С. 207–222.
- Орлова Т.Ю., Селина М.С., Стоник И.В. Видовой состав микроводорослей планктона охотоморского побережья острова Сахалин // *Биол. моря*. 2004. Т. 30, № 2. С. 96–104.
- Орлова Т.Ю., Селина М.С., Стоник И.В. и др. Фитопланктон прибрежных вод острова Сахалин и потенциально токсичные виды в его составе // *Реакция морской биоты на изменения природной среды и климата*. Владивосток: Дальнаука. 2007. С. 233–263.
- Орлова Т.Ю., Стоник И.В., Шевченко О.Г. Флора микроводорослей планктона Амурского залива Японского моря // *Биол. моря*. 2009. Т. 35, № 1. С. 48–61.
- Роспотребнадзор. Экспресс-определение омега-3 кислот в моллюсках с помощью тест-системы "DSP-Check" производства фирмы Parapharm Laboratories Co., Ltd, Япония // *Методические рекомендации*. МР 01.016-07. 2007.
- Рябушко Л.И. Атлас токсичных микроводорослей Чёрного и Азовского морей. Севастополь: ЭКОСИГидрофизика. 2003. 140 с.
- Селина М.С. Морфология и сезонная динамика потенциально токсичной микроводоросли *Prorocentrum foraminosum* Faust 1993 (Dinophyta) в заливе Петра Великого Японского моря // *Биол. моря*. 2017. Т. 43, № 3. С. 169–174.
- Семина Г.И. Распределение фитопланктона в Кроноцком заливе // *Тр. Ин-та океанол. АН СССР*. 1959. Т. 36. С. 73–91.
- Anderson D. Monitoring and management strategies for harmful algal blooms in coastal waters. Paris, France: Asia Pacific Economic Program and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. 2001. 268 p.
- Anonymous. Regulation (EC) No. 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 // *Off. J. Eur. Union*. 2004. Vol. L139. P. 55–205.

- Anonymous*. Marine biotoxins in shellfish – okadaic acid and analogues – scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain // EFSA J. 2008. Vol. 589. P. 1–62.
- Anonymous*. Commission regulation (EU) No. 15/2011 // Off. J. Eur. Union. 2011. Vol. L 6/3. P. 1–3.
- Bauder A.G., Cembella A.D., Bricelj V.M., Quilliam M.A.* Uptake and fate of diarrhetic shellfish poisoning toxins from the dinoflagellate *Prorocentrum lima* in the bay scallop *Argopecten irradians* // Mar. Ecol. Prog. Ser. 2001. Vol. 213. P. 39–52.
- Blanco J., Fernández M.L., Miguez A., Moroño A.* Okadaic acid depuration in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: one- and two-compartment models and the effect of environmental conditions // Mar. Ecol. Prog. Ser. 1999. Vol. 176. P. 153–163.
- Blanco J., Mariño C., Martín H., Acosta C.P.* Anatomical distribution of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in the mussel *Mytilus galloprovincialis* // Toxicon. 2007. Vol. 50, no. 8. P. 1011–1018.
- Cembella A.D.* Chemical ecology of eukaryotic microalgae in marine ecosystems // Phycologia. 2003. Vol. 42, no. 4. P. 420–447.
- Dawson J.F., Holmes C.F.* Molecular mechanisms underlying inhibition of protein phosphatases by marine toxins // Front. Biosci. 1999. Vol. 4, no. 1. P. D646–D658.
- Deeds J.R., Wiles K., Heideman G.B.* et al. First U.S. report of shellfish harvesting closures due to confirmed okadaic acid in Texas Gulf coast oysters // Toxicon. 2010. Vol. 55, no. 6. P. 1138–1146.
- Dominguez H.J., Paz B., Daranas A.H.* et al. Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectenotoxin and okadaic acid toxin groups: characterization, analysis and human health implications // Toxicon. 2010. Vol. 56, no. 2. P. 191–217.
- Dounay A.B., Forsyth C.J.* Okadaic acid: the archetypal serine/threonine protein phosphatase inhibitor // Curr. Med. Chem. 2002. Vol. 9. P. 1939–1980.
- Eberhart B.-T.L., Moore L.K., Harrington N.* et al. Screening tests for the rapid detection of diarrhetic shellfish toxins in Washington State // Mar. Drugs. 2013. Vol. 11. P. 3718–3734.
- Farrell H., Gentien P., Fernand L.* et al. Scales characterising a high density thin layer of *Dinophysis acuta* Ehrenberg and its transport within a coastal jet // Harmful Algae. 2012. Vol. 15. P. 36–46.
- Hoppenrath M., Chomerat N., Horiguchi T.* et al. Taxonomy and phylogeny of the benthic *Prorocentrum* species (Dinophyceae) – a proposal and review // Harmful Algae. 2013. Vol. 27. P. 1–28.
- Hu T., Curtis J.M., Walter J.A., Wright J.L.C.* Identification of DTX-4, a new water-soluble phosphatase inhibitor from the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1995. Vol. 5. P. 597–599.
- Hu T., LeBlanc P., Burton I.W.* et al. Sulfated diesters of okadaic acid and DTX-1: Self-protective precursors of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins // Harmful Algae. 2017. Vol. 63. P. 85–93.
- James K.J., Bishop A.G., Carmody E.P., Kelly S.S.* Detection methods for okadaic acid and analogues // Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection. 2000. CRC Press. P. 217–238.
- Kameneva P.A., Efimova K.V., Rybin V.G., Orlova T.Y.* Detection of dinophysistoxin-1 in clonal culture of marine dinoflagellate *Prorocentrum foraminosum* (Faust M.A., 1993) from the Sea of Japan // Toxins. 2015a. Vol. 7, no. 10. P. 3947–3959.
- Kameneva P.A., Efimova K.V., Selina M.S., Orlova T.Y.* *Prorocentrum foraminosum* Faust (Dinophyceae) as a potential source of DSTs in the Peter the Great bay Sea of Japan (East Sea) // PICES-2016 Annu. Meet. “25 years of PICES: celebrating the past, imagining the future”. San Diego. 2016. P. 345.
- Kameneva P.A., Imbs A.B., Orlova T.Y.* Distribution of DTX-3 in edible and non-edible parts of *Crenomytilus grayanus* from the Sea of Japan // Toxicon. 2015b. Vol. 98. P. 1–3.
- Kameneva P.A., Orlova T.Y.* Diarrhetic shellfish poisoning in socio-economic perspective in Prymorsky region, Russia // PICES-2015 Annu. Meet. “Change and sustainability of the North Pacific”. Qingdao, China. 2015. P. 130.
- Konovalova G.V.* Toxic and potentially toxic dinoflagellates from Far East coastal waters of Russia // Toxic phytoplankton blooms in the sea. Proc. Fifth Int. Conf. on Toxic Marine Phytoplankton. Newport, Rhode Island, U.S.A. Elsevier. 1993. P. 275–279.
- Li A., Ma J., Cao J., McCarron P.* Toxins in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) associated with diarrhetic shellfish poisoning episodes in China // Toxicon. 2012. Vol. 60, no. 3. P. 420–425.
- Louppis A.P., Badeka A.V., Katikou P.* et al. Determination of okadaic acid, dinophysistoxin-1 and related esters in Greek mussels using HPLC with fluorometric detection, LC–MS/MS and mouse bioassay // Toxicon. 2010. Vol. 55, no. 4. P. 724–733.
- Louzao M.C., Fernández D.A., Abal P.* et al. Diarrhetic effect of okadaic acid could be related with its neuronal action: changes in neuropeptide Y // Toxicol. Lett. 2015. Vol. 237, no. 2. P. 151–160.
- MacKenzie L.A., Selwood A.I., Marshall C.* Isolation and characterization of an enzyme from the Greenshell™ mussel *Perna canaliculus* that hydrolyses pectenotoxins and esters of okadaic acid // Toxicon. 2012. Vol. 60, no. 3. P. 406–419.
- Madigan T.L., Lee K.G., Padula D.J.* et al. Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in South Australian shellfish // Harmful Algae. 2006. Vol. 5, no. 2. P. 119–123.
- Marcaillou C., Haure J., Mondegue F.* et al. Effect of food supply on the detoxification in the blue mussel, *Mytilus edulis*, contaminated by diarrhetic shellfish toxins // Aquat. Living Resour. 2010. Vol. 23, no. 3. P. 255–266.
- Marr J.C., McDowell L.M., Quilliam M.A.* Investigation of derivatization reagents for the analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins by liquid chromatography with fluorescence detection // Nat. Toxins. 1994. Vol. 311. P. 302–311.
- McNabb P.* Chemistry, metabolism and chemical analysis of okadaic acid group toxins // Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection: 2nd ed. Boca Raton, U.S.A.: CRC Press. 2008. P. 209–228.
- McNabb P., Holland P.T.* Ester forms of okadaic acid and dinophysistoxins in shellfish // Cawthron Rep. 2002. No. 748. P. 1–21.
- Morton S.L., Vershinin A., Smith L.L.* et al. Seasonality of *Dinophysis* spp. and *Prorocentrum lima* in Black Sea phytoplankton and associated shellfish toxicity // Harmful Algae. 2009. Vol. 8, no. 5. P. 629–636.
- Mouratidou T., Kaniou-Grigoriadou I., Samara C., Kouimtzi T.* Detection of the marine toxin okadaic acid in mussels during a diarrhetic shellfish poisoning (DSP) episode in Thermaikos Gulf, Greece, using biological, chemical and immunological methods // Sci. Total Environ. 2006. Vol. 366, no. 2–3. P. 894–904.
- Munday R.* Is protein phosphatase inhibition responsible for the toxic effects of okadaic acid in animals? // Toxins. 2013. Vol. 2. P. 267–285.
- Okolodkov Y.B.* The global distributional patterns of toxic, bloom dinoflagellates recorded from the Eurasian Arctic // Harmful Algae. 2005. Vol. 4, no. 2. P. 351–369.
- Orlova T.Y.* Diversity of potentially toxic microalgae on the east coast of Russia // Marine biodiversity and ecosystem dynamics of the Northwest Pacific Ocean. Beijing: Science Press. 2013. P. 77–91.

- Orlova T.Y., Kameneva P.A., Stonik I.V. et al. Diarrhetic shellfish toxins in Primorsky Krai, Russia // J. Shellfish Res. 2015. Vol. 34, no. 3. P. 1151–1160.
- Park G.M., Kim S., Kim H.S. et al. First successful culture of the marine dinoflagellate *Dinophysis acuminata* // Aquat. Microb. Ecol. 2006. Vol. 45, no. 2. P. 101–106.
- Prassopoulou E., Katikou P., Georgantelis D., Kyritsakis A. Detection of okadaic acid and related esters in mussels during diarrhetic shellfish poisoning (DSP) episodes in Greece using the mouse bioassay, the PP2A inhibition assay and HPLC with fluorimetric detection // Toxicon. 2009. Vol. 53, no. 2. P. 214–227.
- Reguera B., Pizarro G. Planktonic dinoflagellates that contain polyether toxins of the old “DSP complex” // Seafood and freshwater toxins. Boca Raton: CRC Press. 2008. P. 257–284.
- Reguera B., Riobó P., Rodríguez F. et al. *Dinophysis* toxins: causative organisms, distribution and fate in shellfish // Mar. Drugs. 2014. Vol. 12. P. 394–461.
- Reguera B., Velo-Suárez L., Raine R., Park M.G. Harmful *Dinophysis* species: a review // Harmful Algae. 2012. Vol. 14. P. 87–106.
- Reizopoulou S., Strogyloudi E., Giannakourou A. et al. Okadaic acid accumulation in macrofilter feeders subjected to natural blooms of *Dinophysis acuminata* // Harmful Algae. 2008. Vol. 7, no. 2. P. 228–234.
- Rodríguez-Velasco M.L. Toxin monitoring programs and regulatory view // Seafood and freshwater toxins. Boca Raton: CRC Press. 2008. P. 919–932.
- Selina M.S., Levchenko E.V. Species composition and morphology of dinoflagellates (Dinophyta) of epiphytic assemblages of Peter the Great Bay in the Sea of Japan // Russ. J. Mar. Biol. 2011. Vol. 37, no. 1. P. 23–32.
- Stabell O.B., Hormazabal V., Steffenak I., Pedersen K. Diarrhetic shellfish toxins: improvement of sample clean-up for HPLC determination // Toxicon. 1991. Vol. 29, no. 1. P. 21–29.
- Suárez-Gómez B., Souto M.L., Norte M., Fernández J.J. Isolation and structural determination of DTX-6, a new okadaic acid derivative // J. Nat. Prod. 2001. Vol. 64, no. 10. P. 1363–1364.
- Suzuki T., Igarashi T., Ichimi K., Watai M. Kinetics of diarrhetic shellfish poisoning toxins, okadaic acid, dinophysistoxin-1, pectenotoxin-6 and yessotoxin in scallops *Patinopecten yes-soensis* // Fish. Sci. 2005. P. 948–955.
- Suzuki T., Ota H., Yamasaki M. Direct evidence of transformation of dinophysistoxin-1 to 7-O-acyl-dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) in the scallop *Patinopecten yessoensis* // Toxicon. 1999. Vol. 37, no. 1. P. 187–198.
- Suzuki T., Quilliam M.A. LC-MS/MS analysis of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins, okadaic acid and dinophysistoxin analogues, and other lipophilic toxins // Anal. Sci. 2011. Vol. 27, no. 6. P. 571–584.
- Svensson S. Depuration of Okadaic acid (Diarrhetic Shellfish Toxin) in mussels, *Mytilus edulis* (Linnaeus), feeding on different quantities of nontoxic algae // Aquaculture. 2003. Vol. 218, no. 1–4. P. 277–291.
- Tachibana K., Scheuer P.J., Tsukitani Y. et al. Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria* // J. Amer. Chem. Soc. 1981. Vol. 103, no. 9. P. 2469–2471.
- Torgersen T., Lindegarth S., Ungfors A., Sandvik M. Profiles and levels of fatty acid esters of okadaic acid group toxins and pectenotoxins during toxin depuration. Part I: Brown crab (*Cancer pagurus*) // Toxicon. 2008. Vol. 52, no. 3. P. 407–417.
- Trainer V.L., Moore L., Bill B.D. et al. Diarrhetic shellfish toxins and other polyether toxins of human health concern in Washington State // Mar. Drugs. 2013. Vol. 11. P. 1–15.
- Tubaro A., Dell'Ovo V., Sosa S., Florio C. Yessotoxins: a toxicological overview // Toxicon. 2010. Vol. 56, no. 2. P. 163–172.
- Tubaro A., Sosa S., Bornancin A., Hungerford J. Pharmacology and toxicology of diarrhetic shellfish toxins // Seafood and freshwater toxins. Boca Raton: CRC Press. 2008. P. 229–253.
- Valdiglesias V., Prego-Faraldo M.V., Pásaro E. et al. Okadaic acid: more than a diarrhetic toxin // Mar. Drugs. 2013. Vol. 11, no. 11. P. 4328–4349.
- Vale P., Antónia M., Sampayo M. Esters of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in Portuguese bivalves related to human poisonings // Toxicon. 1999. Vol. 37, no. 8. P. 1109–1121.
- Vale P., Sampayo M.A. Esterification of DSP toxins by Portuguese bivalves from the Northwest coast determined by LC-MS – a widespread phenomenon // Toxicon. 2002. Vol. 40, no. 1. P. 33–42.
- Vershinin A., Moruchkov A., Morton S.L. et al. Phytoplankton composition of the Kandalaksha Gulf, Russian White Sea: *Dinophysis* and lipophilic toxins in the blue mussel (*Mytilus edulis*) // Harmful Algae. 2006. Vol. 5, no. 5. P. 558–564.
- Wang Z., Broadwater M.H., Ramsdell J.S. Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins and pectenotoxin-2 in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) by liquid chromatography–tandem mass spectrometry // J. Chromatogr. A. 2015. Vol. 1416. P. 22–30.
- Yasumoto T., Murata M., Oshima Y. et al. Diarrhetic shellfish toxins // Tetrahedron. 1985. Vol. 41, no. 6. P. 1019–1025.
- Yasumoto T., Oshima Y., Yamaguchi M. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 1978. Vol. 44, no. 11. P. 1249–1255.

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИНАМИКИ ВЫЖИВАЕМОСТИ САМОК СЕВЕРНОГО МОРСКОГО КОТИКА *CALLORHINUS URSINUS* (LINNAEUS, 1758) СТАДА ОСТРОВА ТЮЛЕНИЙ*

© 2017 О. Л. Жданова^{1,3}, А. Е. Кузин², Е. Я. Фрисман³

¹Институт автоматизации и процессов управления ДВО РАН, Владивосток 690041;

²Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр, Владивосток 690091;

³Институт комплексного анализа региональных проблем ДВО РАН, Биробиджан 679016

e-mail: ¹axanka@iacp.dvo.ru; ²mormlek@tinro-center.ru; ³frisman@mail.ru

Статья принята к печати 29.09.2016 г.

Исследована динамика выживаемости и численности самок северного морского котика *Callorhinus ursinus* на о-ве Тюлений. Для оценки параметров модели использованы данные о возрастном составе и физиологическом состоянии самок по наблюдениям 1958–1988 гг. Сведения о количестве новорожденных щенков на лежбище в 1958–2013 гг. использованы для оценки адекватности модельных расчётов численности самок. Показано, что с 1958 по 1988 г. в поселении снижалась выживаемость особей младших возрастных групп, уменьшалась доля самок, а также происходило старение популяции. С помощью методов численного моделирования установлено, что после 1988 г. среди особей в возрасте до трёх лет выживаемость самок значительно увеличилась, демонстрируя положительные тенденции динамики их численности.

Ключевые слова: *Callorhinus ursinus*, динамика численности самок, оценка выживаемости, математическое моделирование.

Mathematical modeling of variation in survival of female northern fur seals, *Callorhinus ursinus* (Linnaeus, 1758), on Tyuleniy Island. O. L. Zhdanova^{1,3}, A. E. Kuzin², E. Ya. Frisman³ (¹Institute of Automation and Control Processes, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041; ²Pacific Research Fisheries Center (TINRO Center), Vladivostok 690091; ³Institute for Complex Analysis of Regional Problems, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Birobidzhan 679016)

The dynamics of survival and number of female northern fur seals, *Callorhinus ursinus*, on Tyuleniy Island have been studied. The data on the age structure and physiological condition of females (obtained during observations in 1958–1988) were used to estimate the model parameters. The adequacy of the model estimates of female number was evaluated using the data of the number of newborn pups on the rookery in 1958–2013. It has been found that a reduction in survival of individuals of younger age groups, a decrease in the proportion of females, as well as aging of the population occurred in 1958–1988. The use of the numerical simulation methods has shown that the rate of survival of females among individuals under three years of age increased substantially after 1988, indicating a positive trend in the dynamics of their number. (Biologiya Morya, 2017, vol. 43, no. 5, pp. 310–320).

Keywords: *Callorhinus ursinus*, dynamics of female number, survival rate assessment, mathematical modeling.

В середине прошлого века северный морской котик *Callorhinus ursinus* (Linnaeus, 1758) оказался уникальным объектом популяционных исследований. В 1957 г. в рамках международной Конвенции по сохранению китов северной части Тихого океана Канадой, Японией, СССР и США были организованы масштабные исследования биологии этого вида, включавшие ежегодную оценку численности животных разного пола и возраста на каждом из крупных лежбищ (Interim Convention ..., 1957). Полученные сведения использовались при определении условий и размера допустимой добычи китов. Почти за 30-летний период существования Конвенции были накоплены данные по структуре их популяций, которые послужили основой для построения математических

моделей динамики численности животных этого вида (Ichihara, 1972; Lander, 1979; Chapman, 1981; Eberhardt, 1981; Smith, Polacheck, 1984; York, 1987; Wickens, York, 1997; Lee et al., 2014, и др.). В частности, в 1982 г. была предложена наиболее подробная модель динамики численности и обоснованы методики вычисления её параметров (Frisman et al., 1982). В этой модели на основе более чем 20-летних наблюдений были рассчитаны все модельные параметры, с её помощью получены удовлетворительные результаты прогнозирования численности и решены задачи оптимизации промысла.

Значительный объём биологической информации позволил продолжить моделирование динамики численности половых и возрастных групп стада северного

*Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ, проект № 15-29-02658.

морского котика о-ва Тюлений и оценить внутривидовые параметры, что необходимо для выработки оптимальной стратегии его промышленной эксплуатации. В данной работе изучена динамика выживаемости и численности самок. Используются сведения о количестве новорожденных щенков на лежбище в 1958–2013 гг., а также о возрастном составе и физиологическом состоянии самок, добытых в море с научно-исследовательской целью в 1958–1988 гг. (далее – морские пробы). Материал собран сотрудниками Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра в разные годы (Кузин, 2003, 2010, 2014, 2015; Кузин, Засыпкин, 2010).

Характеристика данных наблюдений состояния популяции северного морского котика

Получить надежные результаты при визуальном подсчёте численности всех половозрастных групп котиков на лежбище практически невозможно. Плотность залегания животных слишком высока, они находятся в постоянном движении, их стада многочисленны и занимают большую и частично труднодоступную для учёта территорию (см.: Ащепков, Кузин, 1986, 1987). Тем не менее непосредственный визуальный подсчёт возможен для двух половозрастных групп популяции – секачей и щенков (табл. 1). Возможность подсчёта щенков обусловлена тем, что до определенного возраста они всё время проводят на лежбище, не спускаясь в море. Секачи же, являясь наиболее крупными животными, в гаремный период практически не перемещаются по лежбищу и легко идентифицируются в гаремах; к тому же число секачей сравнительно невелико. Имеются практически точные данные о численности и возрастном составе животных, добытых в ходе берегового промысла, который по коммерческим требованиям ограничивается добычей 2–5-летних самцов. Возрастной состав особей, добытых

в коммерческих целях, не позволяет судить о возрастном составе самцов в популяции, однако совокупность имеющихся данных довольно успешно используется для построения оценок выживаемости этой группы животных на разных стадиях жизненного цикла (Chapman, 1964; Lander, 1975; Trites, 1989; Corey et al., 2003; Battaile, Trites, 2013; Zeppelin et al., 2015, и др.) и для моделирования динамики их численности.

К сожалению, данные о величине и структуре берегового промысла не содержат информации о состоянии и численности самок в популяции. О количестве гаремных самок, очевидно, можно судить по их численности на лежбище (табл. 2). Однако необходимо учитывать, что это значительно заниженная оценка численности половозрелых самок, поскольку некоторые трехлетние особи вообще не выходят на берег, а другие подолгу кормятся в море. Нижнюю оценку числа половозрелых самок можно получить, зная количество новорожденных детенышей, но для обоснованных суждений о числе и возрастном составе самок необходимо исследовать их физиологическое состояние и возрастной состав в достаточно многочисленных репрезентативных выборках. Для этого с 1958 по 1988 г. самок котиков добывали в море с научно-исследовательскими целями; их репродуктивные органы подвергали полному биологическому анализу. Благодаря проведенной работе имеются значительные выборки самок котиков, для которых известны индивидуальный возраст и физиологическое состояние, в частности, наличие беременности (табл. 3, 4).

Математическая модель динамики численности локальной популяции

Взяв за основу модель динамики численности локальной популяции, предложенную Фрисманом с соавторами (Frisman et al., 1982), в настоящей работе мы ограничимся анализом динамики самок. Обозначим F_0

Таблица 1. Численность щенков северного морского котика (особи) на о-ве Тюлений

Год	Численность	Год	Численность	Год	Численность	Год	Численность
1958	32200	1972	44050	1986	18000	2000	23630
1959	35000	1973	35300	1987	16000	2001	24000
1960	38000	1974	33170	1988	18800	2002	26400
1961	41200	1975	27000	1989	18500	2003	27000
1962	44700	1976	30828	1990	18200	2004	32400
1963	49000	1977	28580	1991	18000	2005	33500
1964	51400	1978	29900	1992	15000	2006	33500
1965	48400	1979	24185	1993	17000	2007	36000
1966	44900	1980	22000	1994	18700	2008	38000
1967	56500	1981	21000	1995	17600	2009	41400
1968	45800	1982	22300	1996	16500	2010	39300
1969	43500	1983	24000	1997	18500	2011	35500
1970	31500	1984	23200	1998	19200	2012	35100
1971	41100	1985	20000	1999	20650	2013	34700

Таблица 2. Численность самок северного морского котика (особи) на лежбище о-ва Тюлений

Год	Численность	Год	Численность	Год	Численность	Год	Численность
1980	21142	1989	12490	1998	17616	2007	26007
1981	17976	1990	16545	1999	15586	2008	27633
1982	14719	1991	14565	2000	16056	2009	32119
1983	19500	1992	13841	2001	15278	2010	31047
1984	18547	1993	14500	2002	18820	2011	30230
1985	–	1994	13100	2003	19139	2012	–
1986	10100	1995	–	2004	20361	2013	30260
1987	15000	1996	14620	2005	25174	–	–
1988	13687	1997	13042	2006	30809	–	–

и M_0 – численность новорожденных самок и самцов соответственно (принято считать, что $F_0 = M_0 = P/2$, где P – общее число новорожденных щенков); F_i – численность самок в возрасте i лет ($i = 3, 10$) и F_{11} – в возрасте 11 лет и старше; $F = \sum_{i=3} F_i$ – общая численность половозрелых

самок. Данные численности изменяются год от года, т.е. играют роль переменных модели. За временной шаг моделирования принимаем один год, так как за это время численности особей успевают измениться вследствие появления нового поколения щенков, перехода особей из

Таблица 3. Численность самок северного морского котика разного возраста, добытых в море

Год	Возраст, лет									Всего
	3	4	5	6	7	8	9	10	10+	
1958	591	319	238	125	63	36	33	19	106	1530
1959	492	438	268	189	113	74	45	20	171	1810
1960	216	216	207	145	102	62	32	11	107	1098
1961	224	212	164	172	98	60	37	33	201	1201
1962	202	172	103	91	78	59	51	22	193	971
1963	219	201	190	116	77	101	57	25	160	1146
1964	181	154	156	123	74	84	74	42	239	1127
1965	115	129	96	83	103	55	51	42	219	893
1966	90	90	91	55	46	40	25	15	91	543
1967	88	77	104	75	79	78	54	42	183	780
1968	7	15	31	26	39	55	35	21	123	352
1969	27	14	25	20	30	31	18	18	70	253
1970	26	30	22	48	50	47	58	43	244	568
1971	88	89	79	41	34	36	30	29	107	533
1972	63	95	110	90	47	81	68	49	291	894
1973	58	51	33	45	32	17	30	34	217	517
1974	34	37	29	39	60	35	23	45	490	792
1975	59	73	103	95	84	81	68	51	612	1226
1976	42	43	56	68	60	55	45	50	362	781
1977	23	18	31	23	18	24	17	26	121	301
1978	6	15	40	31	32	40	36	22	273	495
1979	8	20	13	12	12	12	11	11	39	138
1980	31	52	69	75	75	64	102	69	481	1018
1981	4	11	9	22	16	14	17	11	140	244
1982	54	67	118	86	100	72	70	63	372	1002
1983	33	60	52	46	40	34	44	46	146	501
1984	17	31	41	55	44	38	44	45	184	499
1985	18	12	20	12	17	16	9	19	74	197
1986	9	9	22	16	17	16	24	24	66	203
1987	0	38	30	41	38	32	33	44	179	435
1988	7	13	14	12	17	12	11	14	89	189

Таблица 4. Численность беременных самок северного морского котика разного возраста, добытых в море

Год	Возраст, лет									Всего
	3	4	5	6	7	8	9	10	10+	
1958	8	150	201	102	57	32	30	17	82	679
1959	9	252	219	168	95	62	39	19	125	988
1960	1	102	165	126	94	59	29	11	86	673
1961	3	106	138	130	84	53	35	31	156	736
1962	2	92	84	80	70	52	45	21	153	599
1963	0	75	138	92	69	88	50	21	124	657
1964	1	82	130	106	68	77	66	40	181	751
1965	0	50	62	67	88	41	43	41	156	548
1966	0	29	73	42	37	33	24	15	65	318
1967	4	31	85	68	65	70	48	40	147	558
1968	0	2	20	23	37	50	30	20	100	282
1969	0	1	19	16	29	29	17	18	56	185
1970	0	5	10	36	35	39	52	37	209	423
1971	0	18	53	26	24	28	24	24	83	280
1972	0	21	62	58	36	58	53	38	204	530
1973	0	7	20	26	19	10	25	22	136	265
1974	1	4	16	20	44	29	17	41	375	547
1975	3	23	66	62	69	65	56	44	466	854
1976	2	15	45	57	47	46	41	45	261	559
1977	0	9	22	15	13	23	15	23	101	221
1978	0	7	33	22	32	32	25	22	193	366
1979	0	15	11	10	9	11	11	9	28	104
1980	0	29	58	66	65	56	90	60	363	787
1981	0	8	7	17	14	10	15	10	116	197
1982	1	44	98	76	91	69	61	52	304	796
1983	4	34	36	43	36	31	37	40	123	384
1984	0	24	35	47	38	35	39	43	157	418
1985	0	10	16	12	15	13	8	18	60	152
1986	0	7	20	13	15	14	19	23	57	168
1987	0	22	23	37	32	30	28	42	148	362
1988	0	4	7	10	10	9	6	14	43	103

младших возрастов в старшие (выживания и естественной смертности особей). Промысловое изъятие в этой модели не рассматривается, поскольку не затрагивает самок морского котика. Численности возрастных групп самок в конкретный год n можно записать в виде:

$$2F_0(n) = 2M_0(n) = P(n) = \lambda \bar{v}(n-1)F(n-1) = \lambda F(n), \quad (1)$$

$$F_3(n) = v_{03}(n-3)F_0(n-3), \quad (2)$$

$$F_{i+1}(n) = v_{i,i+1}(n-1)F_i(n-1), \quad i = \overline{3,9}, \quad (3)$$

$$F_{11}(n) = v_{10,11}(n-1)F_{10}(n-1) + v(n-1)F_{11}(n-1), \quad (4)$$

где n – номер года; λ – коэффициент рождаемости (доля рожающих в данном году самок среди всех самок от трёх лет и старше); $v_{i,j}$ – коэффициенты выживаемости самок от i до j лет; v – выживаемость самок от 11 лет и старше; $\bar{v}$ – средняя выживаемость половозрелых самок.

Степень детализации представленной модели обусловлена имеющимися в наличии фактическими данными. В частности, почти все сведения о самках приведены

отдельно только для первых 10 возрастных групп, а для самок от 11 лет и старше указаны суммарные показатели. К тому же самки младших возрастных групп почти не попадают в пробы и информация о численности годовалых и 2-летних самок отсутствует. Это объясняет необходимость моделирования агрегированных возрастных групп, включающих всех самок старше 10 лет, и отсутствие возможности рассматривать в явном виде численности годовалых и 2-летних самок. Правомочность предположения о равенстве численности полов при рождении подтверждена многочисленными исследованиями физиологии морского котика. Так, соотношение полов эмбрионов составляет практически 1: 1 (York, 1987), хотя к моменту рождения встречаются незначительные отклонения от данного соотношения для разных популяций как в одну, так и в другую сторону (Antonelis et al., 1994; Фаулер, 1998; Болтнев, 2011, и др.).

Модель (1–4) не учитывает миграции котиков из одной популяции в другую. Для стада о-ва Тюлений это вполне правомерно, так как ранее было показано (Фрис-

ман и др., 1985), что степень изоляции стада о-ва Тюлений от других репродуктивных группировок северных котилов очень высока. Это стадо почти не пополняется за счёт командорских и прибыловских животных, а местные котилы, в свою очередь, крайне редко мигрируют на другие острова. Такая изоляция даёт основание считать стадо котилов о-ва Тюлений самостоятельной популяцией, что подтверждает вывод Владимирова (1978).

Рассмотрим методики определения коэффициентов модели (1–4), используя сведения о численности приплода, возрастном составе и физиологическом состоянии самок, добытых в море.

Оценка выживаемости разных возрастных групп самок и динамики возрастного состава по имеющимся данным

По данным о физиологическом состоянии самок (табл. 2) можно рассчитать долю беременных особей для каждого года:

$$\lambda(n) = f^*(n)/f(n), \quad (5)$$

где $f(n)$ – количество самок в пробе n -го года, $f^*(n)$ – количество беременных самок в этой пробе (рис. 1).

Количество беременных самок среди особей в каждой отдельной пробе (за некоторый конкретный год) имеет биномиальное распределение. Для построения доверительного интервала использовали асимптотику. Так как во всех имеющихся выборках более 100 особей, а минимальная частота (или доля беременных самок) больше 0.4, частоты (λ) можно считать приблизительно нормально-распределёнными и доверительный интервал найти по формуле:

$$\lambda \pm \sigma_\lambda t_\beta,$$

где $\sigma_\lambda = \sqrt{\lambda(1-\lambda)/N}$ – стандартная ошибка, а t_β – значение обратной функции нормального распределения при заданном уровне значимости β и количестве наблюдений N .

В соответствии с методикой Фрисмана с соавторами (1985), по данным о численности приплода $P(n)$ и о долях беременных особей в морских пробах получим оценку численности самок (рис. 2):

$$F(n) = P(n)/\lambda(n). \quad (6)$$

Зная общую численность самок и их возрастной состав в морских пробах, можно оценить численность самок разных возрастных групп:

$$F_i(n) = F(n)f_i(n)/\sum_j f_j(n), \quad (7)$$

где $f_i(n)$ – количество самок i -го возраста в выборке n -го года (рис. 3А). Необходимо отметить, что на фоне снижения общей численности самок (рис. 2) происходит "старение" популяции: увеличивается доля старших возрастов и уменьшается доля младших (рис. 3Б). Выживаемость самок до трёх лет определим по формуле:

$$v_{03}(n) = F_3(n+3)/(P(n)/2). \quad (8)$$

Результаты вычислений свидетельствуют о снижении выживаемости этой возрастной группы на протяжении всего периода наблюдений (рис. 3В).

В качестве оценок средней выживаемости самок между i -м и $(i+1)$ -м годами примем величину отношения суммарных численностей самок возраста $(i+1)$ к i :

$$v_{i,i+1} = \sum F_{i+1}(n+1)/\sum F_i(n). \quad (9)$$

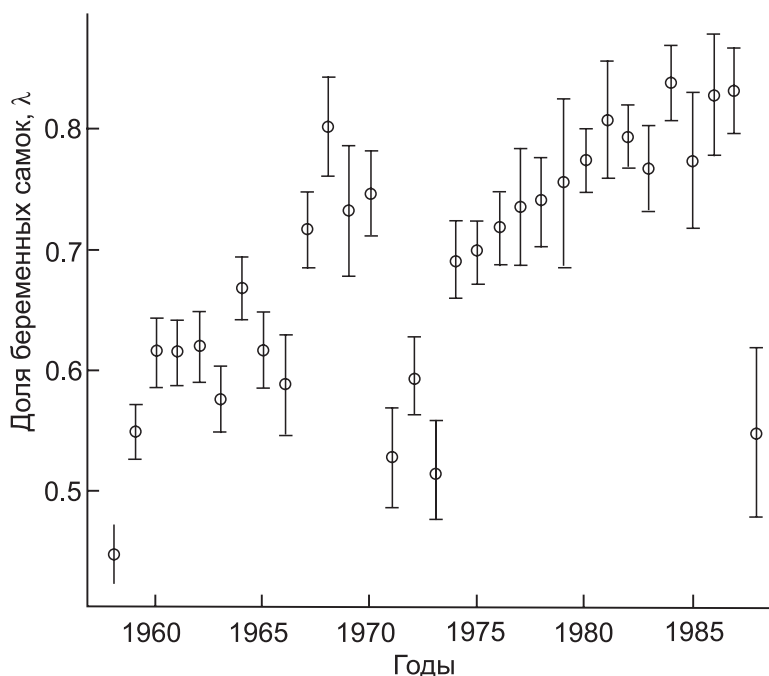


Рис. 1. Доля беременных самок северного морского котика в морских пробах (λ) по годам. Вертикальные линии – 95% доверительный интервал.

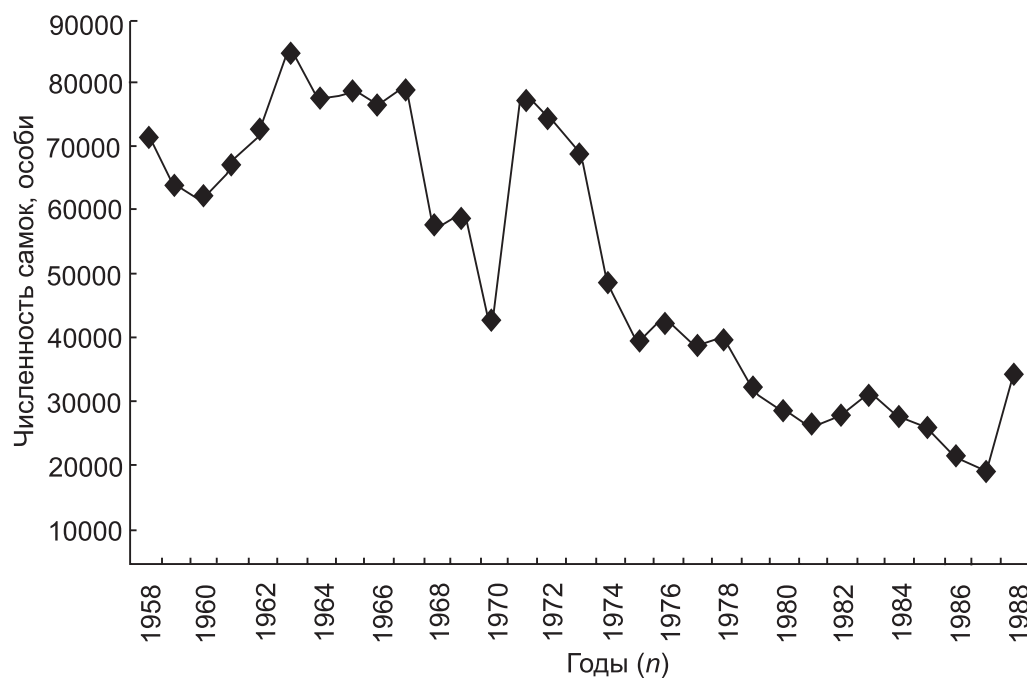


Рис. 2. Численность самок северного морского котика в разные годы.

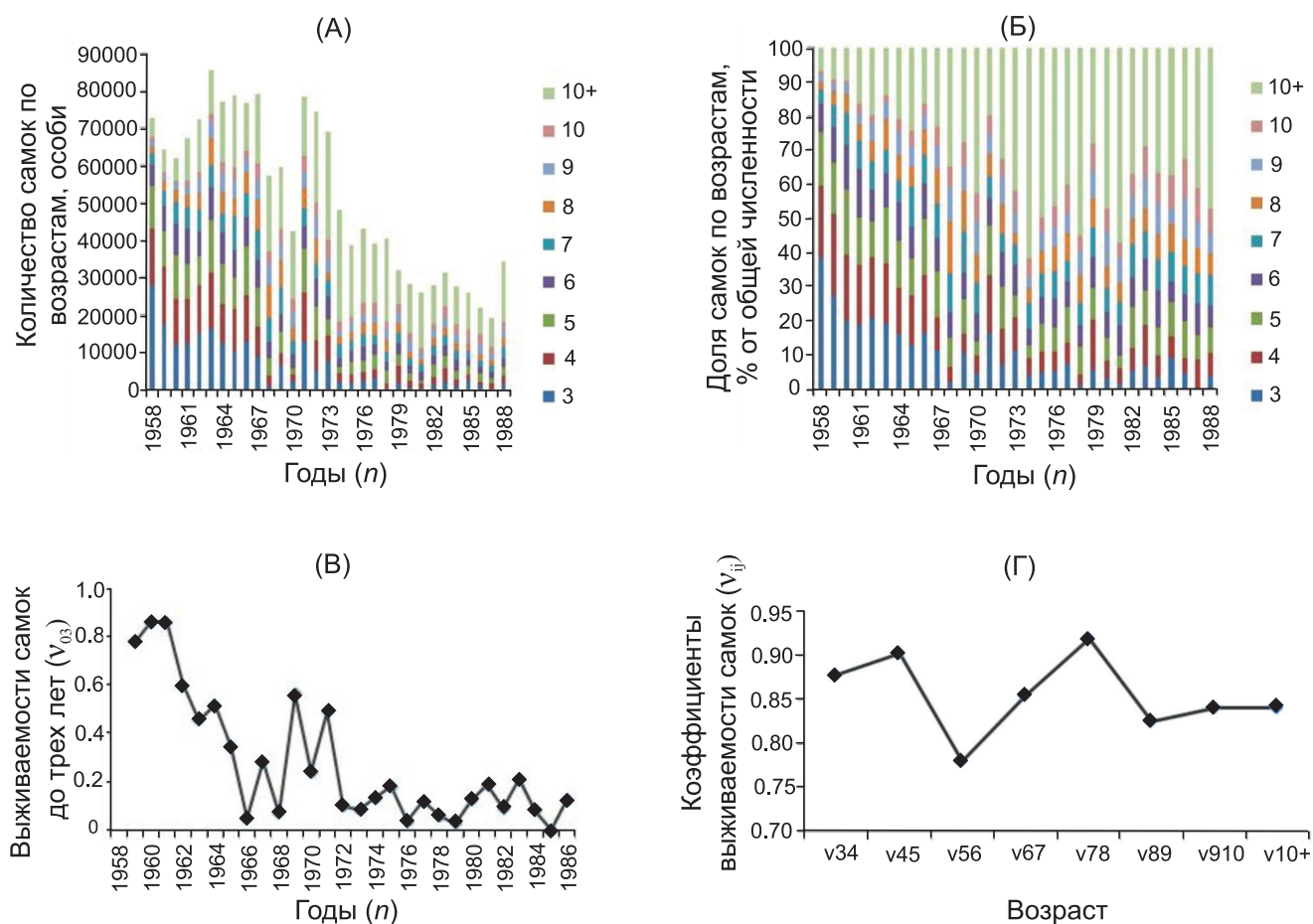


Рис. 3. Оценка состояния самок северного морского котика по морским пробам. А — количество самок в возрасте от трёх лет и старше; Б — возрастной состав самок, % от общей численности; В — динамика выживаемости самок до трёх лет; Г — динамика средней выживаемости самок по возрастам. Столбец численности (А и Б) формируется снизу вверх от меньших возрастов к большим (3-летки, 4-летки и т.д.).

Аналогично рассчитаем среднюю выживаемость самок от рождения до трёх лет:

$$v_{03} = \sum F_3(n+3) / \sum (P(n)/2). \quad (10)$$

Получены следующие значения: $v_{03} = 0.29$, $v_{34} = 0.88$, $v_{45} = 0.90$, $v_{56} = 0.78$, $v_{67} = 0.86$, $v_{78} = 0.92$, $v_{89} = 0.82$, $v_{910} = 0.84$; выживаемость самок старше 10 лет примем равной $v_{1011} = v_{910} = 0.84$ (рис. 3Г).

Расчёт модельной динамики численности самок с фиксированными коэффициентами, определёнными по данным из морских проб

Для расчёта динамики численности половозрелых самок подставим в модель (2–4) полученные оценки их средних выживаемостей $v_{i,j}$. Уравнение (1) возьмем в виде: $F_0(n) = P(n)/2$. Таким образом, используя в качестве исходных данных наблюдаемые численности щенков $P(n)$, получим модельную оценку количества половозрелых самок через несколько лет. При этом модельную численность можно рассчитать на период 1961–2013 гг. Сначала она будет недооценена из-за отсутствия информации о старших возрастах: в 1961 г. 3-летками стали самки 1958 г. рождения и отсутствовала информация о численности самок старше трёх

лет; к 1969 г. это поколение достигло возраста 11 лет, и только к данному году возрастной состав модельной численности самок стал почти полным (не считая отсутствующих сведений о самках старше 11 лет). Чтобы скорректировать этот недостаток, в качестве "начальной численности" для 1958 г. были добавлены расчётные численности $F_4 - F_{10+}$ и F_3 для 1958–1960 гг., оцененные по данным морских проб.

Поскольку информация о реальной численности половозрелых самок отсутствует, определим адекватность полученных модельных оценок, связывая численность половозрелых самок с численностью щенков, рожденных в рассматриваемом году. Для этого рассчитаем примерные пределы допустимой численности половозрелых самок: $F_{\max}(n) = P(n)/\lambda_{\min}$ и $F_{\min}(n) = P(n)/\lambda_{\max}$, определив максимальную и минимальную долю беременных самок ($\lambda_{\min}$ и $\lambda_{\max}$) по данным из морских проб за 1958–1988 гг., равными соответственно 0.44 и 0.84. Если модельная численность половозрелых самок окажется внутри области, ограниченной значениями $F_{\min}(n)$ и $F_{\max}(n)$, то и модельная численность произведенных ими щенков [при выборе соответствующего значения λ внутри наблюдаемого диапазона $\min(\lambda)$, $\max(\lambda)$] будет совпадать с реальной (учётной) численностью новорожденных, т.е. такое зна-

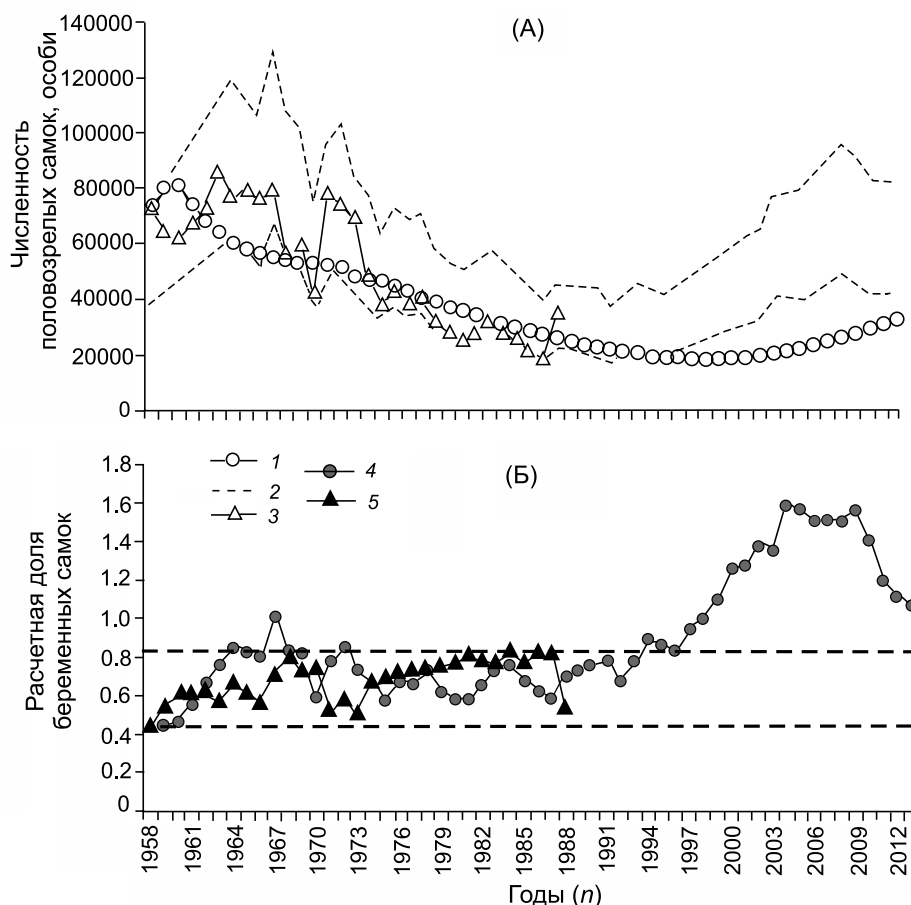


Рис. 4. Модельная динамика численности половозрелых (А) и беременных (Б) самок северного морского котика. Условные обозначения: 1 – модельное значение; 2 – минимальное и максимальное значение параметра; 3 – численность самок, рассчитанная по переменной доле беременных особей в морских пробах (6); 4 и 5 – доли беременных самок в модели и по данным морских исследований соответственно.

чение численности половозрелых самок можно считать адекватным.

Приведена модельная динамика численности половозрелых самок северного морского котика (рис. 4А, F_model) вместе с верхним $F_{max}(n)$ и нижним $F_{min}(n)$ пределами допустимой численности, а также добавлена оценка численности самок $F(n)$, рассчитанная по переменной доле беременных самок в морских пробах (6). Модельная динамика численности половозрелых самок (рис. 4А), рассчитанная по модели (1–4) с постоянными коэффициентами выживаемости самок разного возраста, определенными по выборке: $v_{03} = 0.29$, $v_{34} = 0.88$, $v_{45} = 0.90$, $v_{56} = 0.78$, $v_{67} = 0.86$, $v_{78} = 0.92$, $v_{89} = 0.82$, $v_{910} = v_{10+} = 0.84$, дает значение численности, которое (исключая 1958–1963 гг. – самые ранние годы рассматриваемого периода) тяготеет к нижней границе, а после 1997 г. стабильно находится ниже неё. Это может быть следствием заниженных оценок коэффициентов выживаемости (v_{ij}) или того, что диапазон доли беременных самок в действительности шире, чем определённый по выборке. Если предположить, что выживаемость самок (v_{ij}) определена правильно и, следовательно, модельная численность корректна, то, разделив учётную численность щенков на модельную численность самок [$\lambda_model(n) = P(n)/F_model$], можно увидеть, какой должна была быть динамика среднего количества эмбрионов, приходящихся на одну самку, чтобы получилась наблюдаемая численность щенков (рис. 4Б).

Начиная с 1998 г., модельная численность самок не согласуется с наблюдаемым количеством щенков (все). Причем до середины 1990-х годов (исключая выброс 1967 г., для которого) расчётные значения (v_{ij}) дают адекватную долю беременных. Это позволяет предположить, что коэффициенты выживаемости самок, по-видимому, изменились в более позднем периоде; выживаемость самок должна была существенно увеличиться, иначе они не смогли бы произвести наблюдаемое количество новорожденных щенков. Попробуем оценить, как должны были измениться коэффициенты выживаемости самок, для того чтобы обеспечить такую численность половозрелых особей, которая могла бы дать наблюдаемое количество новорожденных щенков.

Подбор коэффициентов выживаемости, обеспечивающих динамику половозрелых самок, согласующуюся с наблюдаемым количеством щенков

Попытаемся подобрать коэффициенты выживаемости самок так, чтобы их модельная численность оставалась в разумных пределах и могла обеспечить наблюдаемое количество щенков при доле беременных $0 < \lambda < 1$. Был организован численный эксперимент с перебором значений параметров модели и оценкой расчётной динамики половозрелых самок для каждого набора параметров. При этом считали, что выживаемость половозрелых самок в возрасте от трёх до 10 лет примерно постоянна (т.е. может быть описана одним параметром),

а после 10 лет снижается из-за естественного старения; наименьшей выживаемостью характеризуется группа от 0 до трёх лет:

$$\begin{cases} v_{03} < v_{34}, \dots, v_{10+} \\ v_{10+} < v_{34}, \dots, v_{910}. \end{cases}$$

Дополнительно при переборе значений параметров использовали следующие оптимизационные критерии: минимизация количества расчётных численностей самок вне "допустимого интервала" [$F_{min}(n)$, $F_{max}(n)$] и минимизация маловероятных долей беременных особей. В последнем случае находится минимум функции штрафов; значения $\lambda(F)$ вне 95% доверительного интервала получают штраф, обратно пропорциональный вероятности получить такое значение λ (при заданном математическом ожидании и стандартном отклонении); доверительные интервалы рассчитаны для минимального и максимального значения в выборке.

Первый оптимизационный критерий дает несколько вариантов параметров, обеспечивающих одинаково небольшое улучшение по количеству "выбывающих за пределы" численностей (19 против 23 по исходным коэффициентам), но при этом доля беременных особей уже хорошо соответствует разумным пределам: $0 < \lambda < 1$. Оба результата (рис. 5А, Б) очень похожи по значениям подобранных коэффициентов и по качеству наблюдаемой динамики. В частности, в раннем периоде (до 1990-х годов) новые коэффициенты дают завышенную численность самок и, как следствие, доля беременных особей опускается ниже расчётных пределов. В позднем периоде их численность опускается к нижней границе (по-видимому, она занижена), что подтверждает предположение об изменении выживаемости самок после 1988 г. Поэтому естественно было бы разбить весь период наблюдения на две части и подбирать коэффициенты для каждого временного промежутка отдельно.

Для 1958–1988 гг. были оставлены коэффициенты выживаемости, рассчитанные из данных; новые коэффициенты для позднего периода 1989–2013 гг. подбирали с использованием описанных выше оптимизационных критериев. В первом случае получилось множество результатов, когда модельная численность самок в позднем периоде вообще не выходит за пределы [$F_{min}(n)$, $F_{max}(n)$], а во втором случае расчётные доли беременных самок не выходят за пределы 95% доверительного интервала (рис. 6). При этом множество удовлетворительных результатов имеет минимальное значение $v_{03} = 0.465$ (что заметно выше определённого по выборке – 0.29), а максимальное $v_{03} = 0.67$. Выживаемость животных старших возрастов как больше, так и меньше средних по выборке величин (за 1958–1988 гг.). Таким образом, уверенно можно констатировать только то, что должна была увеличиться выживаемость самок в возрасте от 0 до трёх лет (v_{03}), чтобы обеспечить наблюдаемый после затяжной депрессии рост их численности и, как следствие, рост численности щенков.

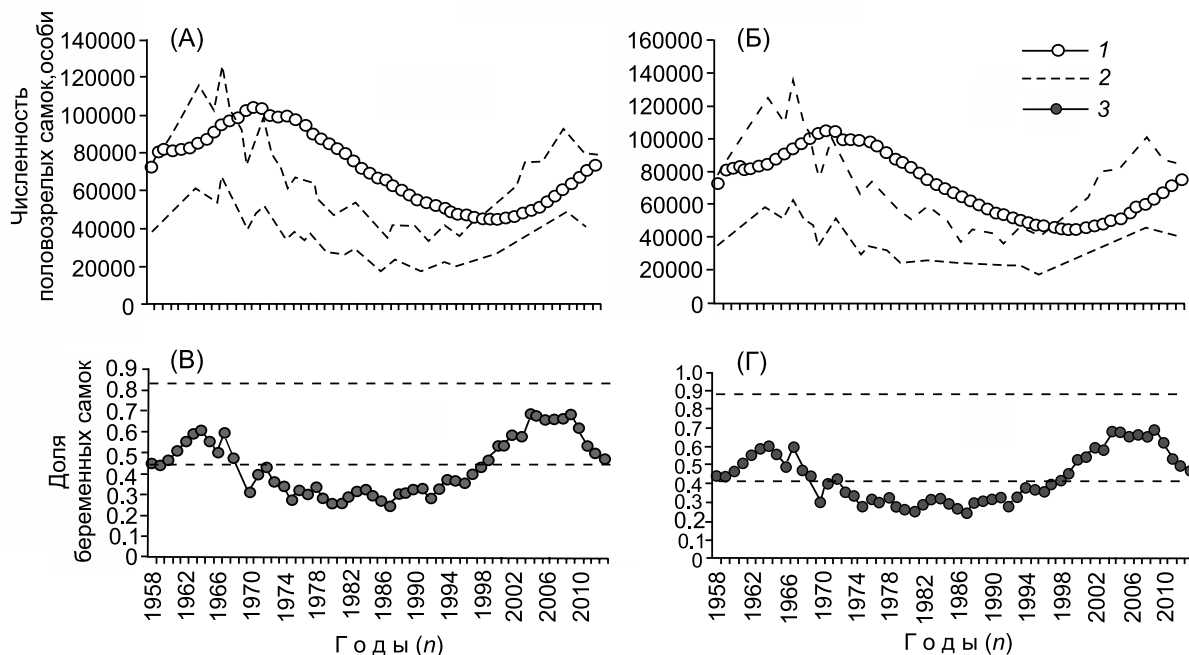


Рис. 5. Модельная динамика численности половозрелых самок (1) и соответствующая ей доля беременных самок (3), необходимая для достижения наблюдаемой численности щенков. А, Б – лучший результат минимизации количества расчетных численностей самок вне "допустимого интервала" [$F_{\min}(n), F_{\max}(n)$]; $v_{03} = 0.6$, $v_{34} = v_{45} = \dots v_{910} = -0.86$, $v_{10+} = 0.85$. Б, Г – лучший результат минимизации маловероятных долей беременных; $v_{03} = 0.59$, $v_{34} = v_{45} = \dots v_{910} \gg 0.856$, $v_{10+} = 0.856$; пунктирная линия (2) – минимальное и максимальное значение параметров.

Дополнить проверку адекватности подобранных коэффициентов можно, сопоставив динамику наблюдаемой численности самок (не принимая во внимание конкретные цифры, так как они занижены из-за постоянного отсутствия части самок на суше) и модельной. Модельная динамика с коэффициентами в позднем периоде из

набора удовлетворительных результатов предыдущего исследования показывает (рис. 7), что модель улавливает тенденции изменения численности, в частности, депрессию 1980-х годов, стабилизацию и медленный выход из неё до начала 2000-х годов, а затем существенный подъём численности.

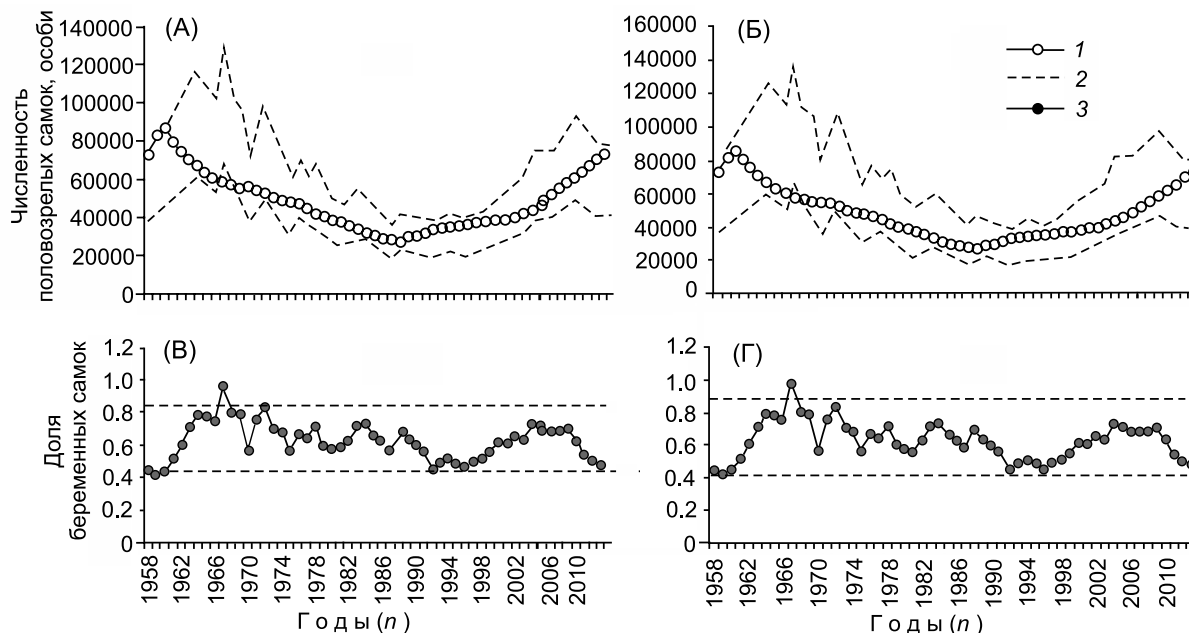


Рис. 6. Примеры расчётных динамик (1 – численность половозрелых самок, 3 – соответствующая доля беременных самок, 2 – минимальные и максимальные значения), не выходящих за пределы оптимизационных критериев в позднем периоде. В раннем периоде (1958–1988 гг.) оставлены коэффициенты выживаемости, определенные по выборке; в позднем (1989–2013 гг.): А, Б – $v_{03} = 0.6$, $v_{34} = v_{45} = \dots v_{910} \approx 0.88$, $v_{10+} = 0.85$; В, Г – $v_{03} = 0.465$, $v_{34} = v_{45} = \dots v_{910} \approx 0.95$, $v_{10+} = 0.88$.

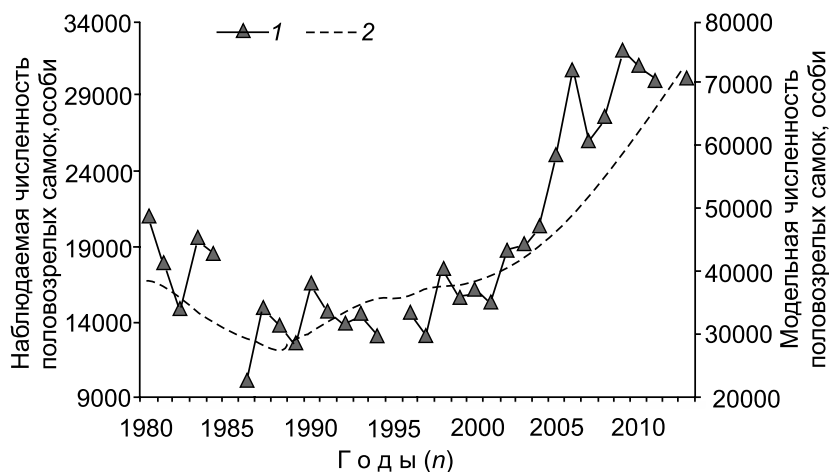


Рис. 7. Динамика наблюдаемой (1) и модельной (2) численности самок северного морского котика на лежбище о-ва Тюлений. Коэффициенты модели: $v_{03} = 0.625$, $v_{34} = v_{45} = \dots v_{910} \approx 0.87$, $v_{10+} = 0.86$.

Обсуждение полученных результатов

В ходе проведенного исследования были обработаны имеющиеся данные о возрастном составе и физиологическом состоянии самок северного морского котика, добытых в море с научно-исследовательскими целями, за 31-летний период с 1958 по 1988 г. Получены оценки их выживаемости до трёх лет отдельно по поколениям, вычислены среднегодовые показатели выживаемости для каждого возраста с трёх до девяти лет, представлена динамика долей беременных самок для этого периода. Показано, что на фоне снижения общей численности самок происходило "старение" данной части популяции: увеличивалась доля старших возрастов и уменьшалась доля младших. Кроме того, весь период наблюдений характеризуется резким снижением выживаемости младшей возрастной группы (от рождения до трёх лет).

Полученные коэффициенты выживаемости самок морского котика, а также наличие среди них определенной доли беременных особей были использованы для моделирования динамики численности половозрелых самок вплоть до настоящего времени. Адекватность модельных расчётов численности самок была оценена с учётом данных о численности новорожденных щенков на лежбище в 1958–2013 гг. Оказалось, что после 1997 г. модельная динамика не согласуется с данными учета щенков на лежбище, что позволяет предположить изменение коэффициентов выживаемости самок в более позднем периоде в сторону их увеличения, иначе они не смогли бы произвести наблюдаемое количество новорожденных особей. В ходе численных экспериментов были подобраны новые коэффициенты выживаемости самок, на основе которых получена достаточно адекватная динамика их численности, согласующаяся с наблюдаемой динамикой численности щенков. При этом лучшими оказались результаты, полученные при разделении всего периода наблюдения на две части и, соответственно, при использовании разных коэффициентов выживаемости самок в раннем и позднем периодах. Это подтверждает предположение об увеличе-

нии выживаемости самок, особенно младшей возрастной группы, после 1988 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аиценок А.Т., Кузин А.Е. Смешиваемость, пути и сроки миграции морских котиков разных стад в тихоокеанских водах Японии // Биол. моря. 1986. № 6. С. 26–32.
- Аиценок А.Т., Кузин А.Е. Возрастной и половой состав стад морских котиков, мигрирующих в тихоокеанских водах Японии // Биол. моря. 1987. № 2. С. 29–38.
- Болтнев А.И. Северный морской котик Командорских островов. М.: Изд-во ВНИРО. 2011. 264 с.
- Владимиров В.А. Популяционный статус стада северных котиков (*Callorhinus ursinus curilensis*) острова Тюленьего // Зоол. журн. 1978. Т. 57, вып. 8. С. 1239–1248.
- Кузин А.Е. Ресурсы северного морского котика сахалинской области и их использование // Изв. ТИНРО. 2003. Т. 133. С. 138–144.
- Кузин А.Е. Интрапопуляционная структура северного морского котика острова Тюленьего в годы выхода из депрессии (1993–2009 гг.) // Изв. ТИНРО. 2010. Т. 161. С. 53–67.
- Кузин А.Е. Новые данные о численности морского котика (*Callorhinus ursinus*), сивуча (*Eumetopias jubatus*) и ларги (*Phoca largha*) на о. Тюленьем (Охотское море) // Изв. ТИНРО. 2014. Т. 178. С. 87–94.
- Кузин А.Е. Анализ промысла северного морского котика (*Callorhinus ursinus*) на о. Тюленьем // Изв. ТИНРО. 2015. Т. 183. С. 71–80.
- Кузин А.Е., Засыпкин М.Ю. Изменчивость частот некоторых фенетических признаков у северного морского котика *Callorhinus ursinus* острова Тюлений и прилегающих акваторий // Биол. моря. 2010. Т. 36, № 5. С. 346–353.
- Фаулер Ч. Северные морские котики на островах Прибылова // Северный морской котик: систематика, морфология, экология, поведение. В 2-х ч. М.: Изд-во Академии наук. 1998. С. 450–498.
- Фрисман Е.Я., Скалецкая Е.И., Кузин А.Е. Математическое моделирование динамики численности северного морского котика и оптимальное управление китовым хозяйством. Владивосток: ДВНЦ АН СССР. 1985. 156 с.
- Antonelis G.A., Ragen T.J., Rooks N.J. Male-biased secondary sex ratios of northern fur seals on the Pribilof Islands, Alaska, 1989

- and 1992 // Fur seal investigations. 1992. NOAA Tech. Mem. NMFS-AFSC. 1994. No. 45. P. 84–89.
- Battaile B.C., Trites A.W. Linking reproduction and survival can improve model estimates of vital rates derived from limited time series counts of pinnipeds and other species // PLoS ONE. 2013. Vol. 8, no. 11. P. e77389.
- Chapman D.G. Critical study of Pribilof fur seal population estimates // Fish. Bull. 1964. Vol. 63. no. 3. P. 657–669.
- Chapman D.G. The northern fur seal – an example of complexity // Problems in management of locally abundant wild mammals. New York: Academic Press / Harcourt Brace Jovanovich, Publishers. 1981. P. 193–204.
- Corey J.A., Bradshaw R.J., Barker R.G. et al. Estimating survival and capture probability of fur seal pups using multistate mark–recapture models // J. Mammal. 2003. Vol. 84, no. 1. P. 65–80.
- Eberhardt L.L. Population dynamics of the Pribilof fur seals // Dynamics of large mammal populations. New York: Wiley. 1981. P. 197–220.
- Frisman E. Ya., Skaletskaya E.I., Kuzyn A.E. A mathematical model of the population dynamics of a local Northern fur seal with seal herd // Ecol. Modell. 1982. Vol. 16, no. 2–4. P. 151–172.
- Ichihara T. Maximum sustainable yield from the Robben fur seal herd // Bull. Far Seas Fish. Res. Lab. (Japan). 1972. No. 6. P. 77–94.
- Interim Convention on Conservation of North Pacific Fur Seals. <http://se-dac.ciesin.columbia.edu/entri/texts/acrc/fur.seals.1957.html>
- Lander R.H. Method of determining natural mortality in the northern fur seal (*Callorhinus ursinus*) from known pups and kill by age and sex // J. Fish. Res. Board Can. 1975. Vol. 32, no. 12. P. 2447–2452.
- Lander R.H. Role of land and ocean mortality in yield of male Alaskan fur seal (*Callorhinus ursinus*) // Fish. Bull. 1979. Vol. 77. P. 311–314.
- Lee O.A., Burkanov V., Neill W.H. Population trends of northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) from a metapopulation perspective // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2014. Vol. 451. P. 25–34.
- Smith T.D., Polacheck T. The population dynamics of the Alaska fur seal: what do we really know? // NWAFC Processed Rep. 1984. Vol. 84, no. 15. 122 p.
- Trites A.W. Estimating the juvenile survival rate of male northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1989. Vol. 46. P. 1428–1436.
- Wickens P., York A.E. Comparative population dynamics of fur seals // Mar. Mammal Sci. 1997. Vol. 13, no. 2. P. 241–292.
- York A.E. Northern fur seal, *Callorhinus ursinus*, eastern Pacific population (Pribilof Islands, Alaska, and San Miguel Island, California) // Status, biology, and ecology of fur seals. NOAA Tech. Rep. NMFS. 1987. No. 51. P. 133–140.
- Zeppelin T.K., Johnson D.S., Kuhn C.E. et al. Stable isotope models predict foraging habitat of northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) in Alaska // PLoS ONE. 2015. Vol. 10, no. 6. P. e0127615. doi:10.1371/journal.pone.0127615

ДИНАМИКА ЧИСЛЕННОСТИ ПРИМОРСКОГО МИНТАЯ *THERAGRA CHALCOGRAMMA* (PALLAS, 1814) (GADIFORMES: GADIDAE) В ЯПОНСКОМ МОРЕ

© 2017 А. Н. Вдовин¹, А. Н. Четырбоцкий², В. В. Нуждин¹

¹Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр, (ТИНРО-центр), Владивосток 690091;

²Дальневосточный геологический институт ДВО РАН, Владивосток 690022

e-mail: vdovin@tinro.ru

Статья принята к печати 01.12.2016 г.

Биомасса запаса приморского минтая *Theragra chalcogramma* за период наблюдений 1976–2016 гг. колебалась от 48 до 373 тыс. т, численность – от 99 до 1115 млн. экз. Выявлено четыре высокоурожайных поколения 1975, 1981, 1997 и 2006 гг. рождения. Показано, что продолжительность периода половозрелости определяет близкую к девятилетней цикличность динамики урожайности поколений. Согласно результатам численного моделирования, рост запасов приморского минтая возможен с 2017 по 2020 г.

Ключевые слова: минтай *Theragra chalcogramma*, динамика численности, прогноз, Японское море.

Dynamics of abundance of the walleye pollock *Theragra chalcogramma* (Pallas, 1814) (Gadiformes: Gadidae) in waters of Primorsky Krai, Sea of Japan. A. N. Vdovin¹, A. N. Chetyrbotsky², V. V. Nuzhdin¹ (¹Pacific Research Fisheries Center (TINRO Center), Vladivostok 690091; ²Far East Geological Institute, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690022)

The biomass of the walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) stock in waters of Primorsky Krai, Sea of Japan, during the observation period 1976–2015 ranged from 48 000 to 373 000 tons; the number, from 99 to 1115 million fish. There have been identified four very strong year-classes born in 1975, 1981, 1997, and 2006. It has been shown that the duration of the sexual maturity period is determined by a periodicity of dynamics of year-class strength close to the nine-year cycle. According to the results of numerical modeling, an increase in the Primorsky walleye pollock stock is expected from 2017 to 2020. (Biologiya Morya, 2017, vol. 43, no. 5, pp. 321–328).

Keywords: walleye pollock *Theragra chalcogramma*, dynamics of abundance, forecast, Sea of Japan.

Приморский минтай *Theragra chalcogramma* (Pallas, 1814) является основным промысловым видом в северо-западной части Тихого океана (Булатов, 2014). Динамику его запасов на акватории Приморья анализировали многие исследователи (Гаврилов, Безлюдный, 1986; Шунтов и др., 1993; Зверькова, 2003, и др.). В качестве единицы запаса принимали минтай зал. Петра Великого, который является только частью ареала приморской популяции (Нуждин, 1998). Подробная информация о динамике численности минтая в зал. Петра Великого приведена в работе Гаврилова и Безлюдного (1986), в которой, однако, описываются лишь тенденции без конкретных количественных оценок. Аргументированного представления о популяционном статусе минтая в зал. Петра Великого до 1990-х годов не было. В частности, весьма популярным было представление Фадеева (1981) о наличии в зал. Петра Великого двух рас минтая (с осенним и весенним типами нереста).

Цель настоящей работы – изучение динамики численности приморского минтая с весенним типом нереста, популяция которого является основной промысловой единицей в российских водах Японского моря.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Использованы материалы научно-исследовательских рейсов (у материкового побережья российских вод Японского

моря), выполненных в 1976–2016 гг. на акватории Приморского края: 41 траловой донной и 17 ихтиопланктонных учётных съёмок. Общее количество промеров – 42.1 тыс. экз. Для составления размерно-возрастного ключа была сформирована выборка из 9153 особей. Возраст рыб определяли по отолитам и чешуе (Нуждин, 2008). Съёмки проводили и рассчитывали оценки обилия в соответствии с принятыми в ТИНРО-центре стандартными методами исследований морских рыб (Борец, 1985; Булатов, 1987; Гаврилов и др., 1988; Фадеев, 1999). Коэффициент уловистости (КУ) принимали равным 0.25, что позволило достичь хорошей сопоставимости результатов разных типов съёмки.

Индекс урожайности поколений принимали равным численности полностью вступившей в промысел возрастной группы 4+. При анализе возрастного состава (см. рис. 1, табл. 1) рассматриваемой выборки минтая было замечено, что в отдельных случаях оценки прямых учётов численности некоторых возрастных групп (начиная с полностью вступивших в промысел четырехгодовиков) нарушают естественный характер их монотонного убывания. Погрешности прямых учётов обусловлены в основном особенностями вертикального распределения минтая. Известно, что взрослые особи минтая тяготеют к придонным слоям воды, но некоторая часть рыб может встречаться в любом другом горизонте, в том числе и на поверхности (Вдовин, Зуенко, 1997).

Процедура восстановления численности размерных (или возрастных) групп по данным о размерном (или возрастном) составе в смежные годы описана нами ранее (Вдовин, 2011; Вдовин и др., 2013). Интерполяция численности особей в воз-

Таблица 1. Возрастной состав (%) приморского минтая в 1976–2015 гг.

Возраст	1+	2+	3+	4+	5+	6+	7+	8+	9+	10+	11+	12+
М	3.49	6.95	17.67	39.33	24.17	6.49	1.36	0.35	0.13	0.05	0.01	0.002
cv	301	148	79	41	60	111	112	137	127	160	174	334

Примечание. М – среднегодовые оценки; cv – коэффициент вариации.

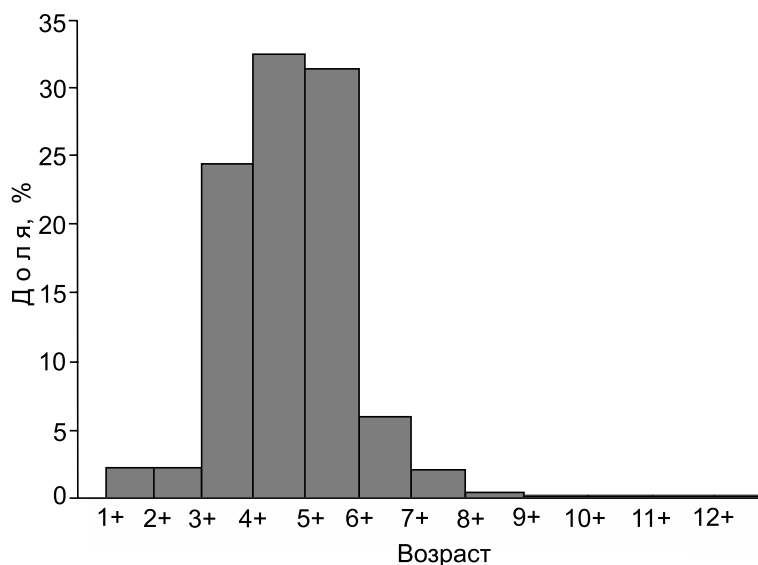


Рис. 1. Распределение возрастных оценок численности приморского минтая *Theragra chalcogramma* среднеурожайного поколения 1990 г. рождения по данным траловых съёмок 1991–2012 гг.

расте 4+–9+ выполнена на основании мальтузианской модели (Рикер, 1979):

$$N_t = N_0 \exp(-Z_t),$$

где N_0 – численность в начальный момент времени (здесь возраст 4+); N_t – численность через определенный промежуток времени t ; Z – мгновенная общая смертность. Размерность: N_0 и N_t – млн. экз., Z – год⁻¹.

Рыб в возрасте старше 9+ объединяли в одну возрастную группу, поскольку они встречались в уловах единично. Было проведено 28 коррекций.

Общую годовую смертность для поколений минтая, начиная с возраста 4+, рассчитывали по методу Робсона–Чепмена. Для каждой возрастной группы её оценивали по совокупности двух смежных возрастных групп в поколении (искомой и последующей) по методу Гейнке (Рикер, 1979). Годовую промысловую смертность определяли как соотношение вылов/запас (отдельных возрастных групп или их совокупности), естественную смертность – как разность годовой и промысловой смертности (Рикер, 1979).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По данным учётных съёмок за 1976–2016 гг. биомасса приморского минтая изменялась от 32 до 310 тыс. т и в среднем составляла 165 тыс. т. Численность этого вида составляла 66–1115 млн. экз., в среднем – 468 млн. экз. Максимальная оценка биомассы превышала минимальную в 9.7 раза, а соответствующая кратность по численности достигала 18.6. Коэффициенты вариации для оценок численности и биомассы составляли 60.3 и 56.1%

соответственно. В среднем скорректированные оценки запаса минтая незначительно превышали исходные и характеризовались меньшей изменчивостью. Биомасса колебалась в пределах 48–373 тыс. т, численность – 99–1218 млн. экз. Средние оценки составляли соответственно 185 тыс. т и 531 млн. экз. Кратность экстремальных оценок в весовом исчислении достигала 7.7, в численном – 11.2. Коэффициенты вариации этих показателей составляли 48.7 и 52.5% соответственно.

Наибольший и стабильный уровень запасов минтая, оцененный по скорректированным оценкам, был отмечен в 1978–1986 гг. (средняя биомасса 308 тыс. т) (рис. 2). В дальнейшем наблюдалось снижение его запасов; средняя биомасса снижалась более чем в 2 раза (до 153 тыс. т). Кратковременное повышение запасов минтая, отмеченное в 1998–2002 гг. и в 2007–2011 гг., было вызвано высокоурожайными поколениями 1997 и 2006 гг. рождения (рис. 3). Динамика запаса определяется динамикой урожайности поколений, однако она была более сглажена. В динамике урожайности поколений выделяются два периода по величине и вариабельности их численности: 1973–1989 гг. с невысокой вариабельностью урожайности (4 раза) и высоким средним уровнем индекса урожайности (344 млн. экз.), а также 1990–2013 гг. с резкими колебаниями индекса урожайности (в 37.9 раза) и со снижением его среднего значения в 2.3 раза (до 152 млн. экз.). По индексу урожайности поколений за период исследова-

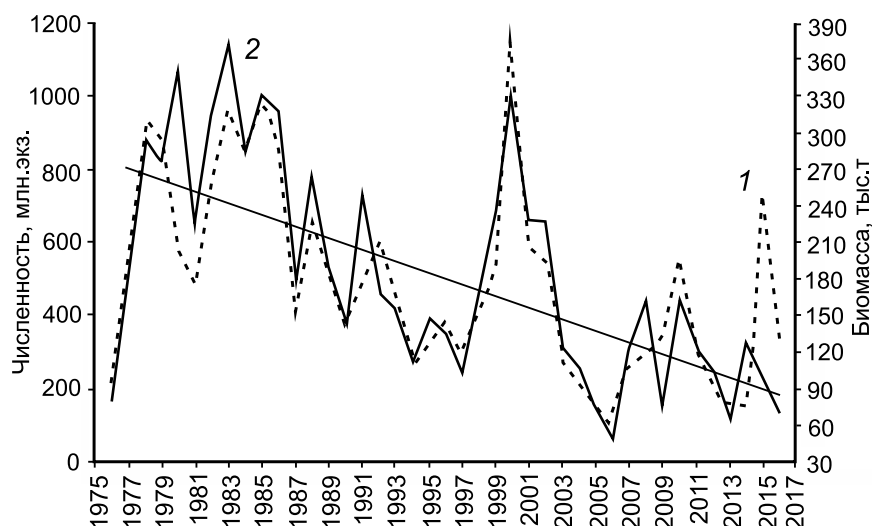


Рис. 2. Динамика запаса приморского минтая *Theragra chalcogramma* в 1976–2016 гг. 1 – численность, млн. экз.; 2 – биомасса, тыс. т; прямая линия – тренд биомассы.

ний было выявлено четыре высокоурожайных поколения 1975, 1981, 1997 и 2006 гг. рождения с численностью рыб 494, 565, 554 и 491 млн. экз. соответственно. Только поколение 2006 г. не вызвало значительного подъема запасов, поскольку возникло на фоне низкоурожайных поколений, в то же время оно определило успех промысла с 2009 по 2013 г.

Интенсивность промысла приморского минтая определялась уровнем запасов и экономической составляющей. Максимальный вылов минтая пришелся на 1980 г. на период самого высокого уровня запасов (рис. 4). Но при этом же уровне запасов с 1981 г. уловы минтая стали резко снижаться, что было связано с переключением флота в летнее время на добычу дальневосточной сардины *Sardinops melanostictus* (см.: Гаврилов, 1998). Доля

изъятия минтая была наибольшей в 1980 и 1981 гг. (соответственно 0.45 и 0.42). Однако этот вылов не оказал существенного влияния на состояние запасов (рис. 4). Промысловая смертность поколений 1973–1982 гг. рождения изменялась от 0.11 до 0.31. Может ли подобная промысловая нагрузка (0.42–0.45 изъятия) не быть чрезмерной в течение более длительного времени? По-видимому, она допустима только при высоком уровне запасов и стабильно высоком пополнении. Наибольшие коэффициенты общей смертности (0.87 и 0.89) получены именно для 1980 и 1981 гг., что, несомненно, было обусловлено высокой интенсивностью промысла. Общая смертность поколений 1975 и 1976 гг., слагавших основу промыслового запаса 1980 и 1981 гг., оказалась заметно выше средней – 0.85 и 0.88. Но близкие по величине высокие

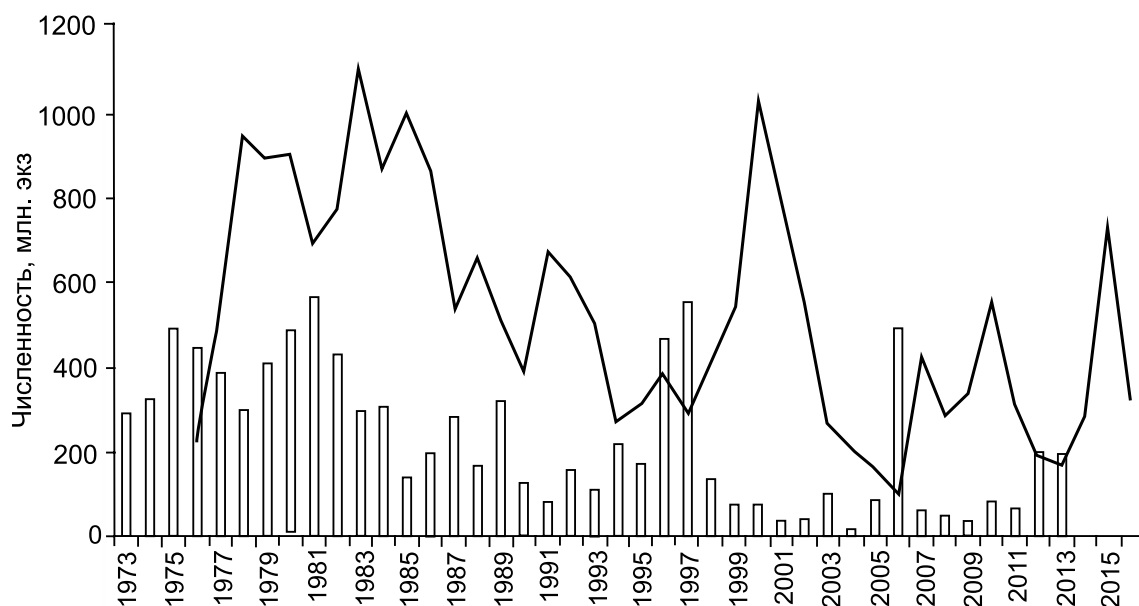


Рис. 3. Динамика численности запаса (сплошная линия) и индекса урожайности поколений (гистограмма) приморского минтая *Theragra chalcogramma* в 1973–2015 гг.

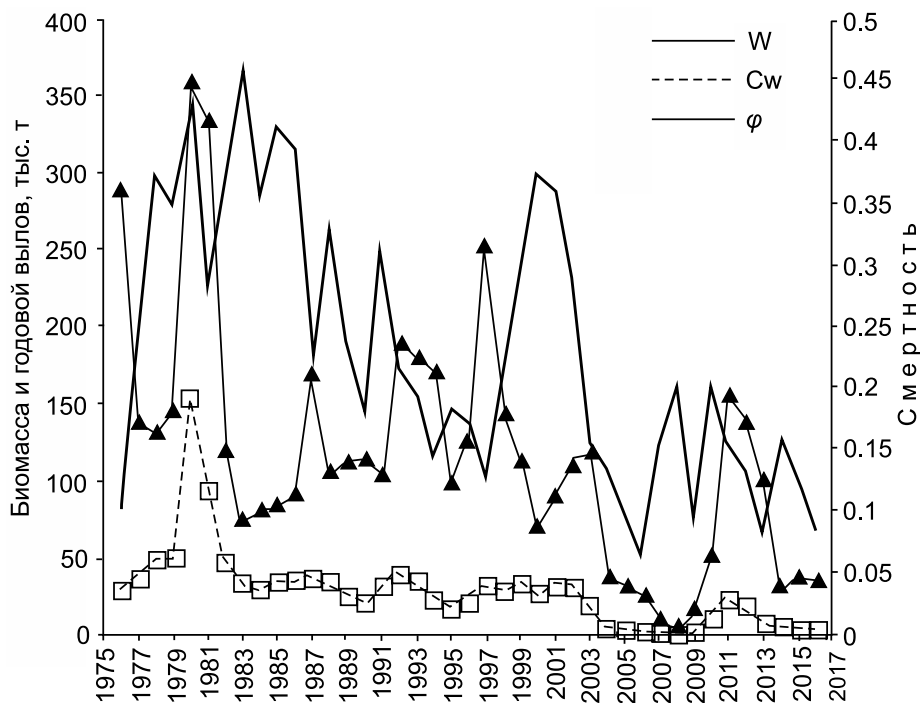


Рис. 4. Динамика учтенной биомассы (W), годового вылова (Cw) и годовой промысловой смертности (ϕ) приморского минтая *Theragra chalcogramma*.

значения этого показателя были отмечены ещё 4 раза: при разной интенсивности промысла и разной величине запаса. Два значения приходится на период низкой численности, это поколения 2005 и 2010 гг. рождения, когда интенсивность промысла была невысокой (рис. 4).

Годовая смертность минтая (A) изменялась от 0.52 до 0.89. При этом низкий коэффициент корреляции 0.26 указывает на отсутствие её зависимости от урожайности поколений. Средние значения общей годовой смертности при более высокой урожайности лишь незначительно превышают смертность менее урожайных поколений (табл. 2). Среди 12 сравниваемых пар чисел только у рыб в возрасте 5+ коэффициент A достоверно выше при более высоком уровне численности: критерий Стьюдента $t = 3.13$, т.е. больше стандартного значения $t_{st} = 2$ при $p = 0.01$.

Для многих видов животных, в том числе рыб, является естественной связь между смертностью и их численностью (Вдовин, 1988; Вдовин, Антоненко, 2001; Шилов, 2001; Панченко, Вдовин, 2005). Для приморского минтая

такая связь не прослеживается, что, вероятно, обусловлено его высокой численностью. Даже минимальные значения численности этого вида оцениваются в десятки миллионов экземпляров. Фактор плотности вряд ли имеет существенное значение, поскольку популяции минтая занимают обширные акватории и обитают в широком батиметрическом диапазоне (Шунтов и др., 1993). Минимальная смертность минтая среди рассмотренных возрастных групп наблюдается у четырехгодовиков (табл. 2), т.е. в возрасте массового полового созревания, что типично для рыб (Кушинг, 1979). Достоверные возрастные отличия проявились только по показателю общей смертности. В возрасте 4+ она достоверно меньше, чем в более старших возрастных группах: t колеблется от 3.32 до 4.79, $t_{st} = 2$ при $p = 0.01$. Остальные возрастные различия показателей смертности недостоверны. Начиная с возраста 5+ смертность минтая почти стабильна, но весьма высока, что проявляется в стремительной убыли численности рыб по мере старения (рис. 1). На естественную смертность (от общей годовой) в среднем приходится 80%. Таким

Таблица 2. Изменчивость общей годовой (A) и естественной годовой (M) смертности приморского минтая в зависимости от возраста и величины индекса урожайности поколений (N_g)

N_g	Показатель	Годовая смертность в возрасте						
		4+	5+	6+	7+	8+	9+	4+–12+
< 190 млн. экз.	A	0.53	0.63	0.68	0.61	0.64	0.66	0.66
	M	0.42	0.52	0.57	0.52	0.55	0.56	0.56
> 190 млн. экз.	A	0.52	0.80	0.72	0.74	0.68	0.71	0.70
	M	0.37	0.62	0.53	0.57	0.55	0.58	0.56
Все поколения	A	0.52	0.72	0.70	0.68	0.66	0.69	0.69
	M	0.39	0.57	0.55	0.55	0.55	0.57	0.56

образом, можно с большой долей уверенности предположить, что колебания численности приморского минтая определяются естественными причинами. По данным Зверьковой (2003), естественная смертность минтая в северной части Японского моря составляет 0.29, это заметно меньше величин, полученных нами. Естественная смертность половозрелого восточноохотоморского минтая при отсутствии промысла составляет 0.52 (Качина, Сергеева, 1984), что практически идентично нашим оценкам; для облавливаемых популяций она снижается до 0.32. Возможно, что при стабильно интенсивном промысле для приморского минтая мы получили бы подобные оценки естественной смертности.

Связь родители–потомки у приморского минтая не прослеживается. Корреляционные связи между урожайностью поколений и различными показателями родительского стада (численность производителей, половозрелых самок и т.д.) отсутствуют (Нуждин, 2016). На основе собственных расчётов и литературных данных Булатов (2014) пришёл к такому же выводу для минтая зал. Аляска, Берингова и Охотского морей, а также тихоокеанских вод Японии. В его работе рассмотрен ряд примеров довольно тесных связей между температурой и урожайностью поколений минтая, хотя подобные связи были выявлены не для всех рассмотренных популяций. Достоверных связей динамики численности приморского минтая с солнечной активностью и климатическим тихоокеанским индексом PDO выявить не удалось.

Для анализа причинно-следственных связей между численностью приморской популяции минтая и температурой лабораторией океанологии ТИНРО-центра были любезно предоставлены данные по температуре на гидрологическом разрезе по 132° в.д. и на поверхности прибрежной акватории Приморского края между 42° и 45° с.ш. за февраль–апрель, когда происходит нерест минтая. Связь индекса урожайности поколений с температурой на гидрологическом разрезе до слоя скачка оказалась непоказательной: коэффициент корреляции $r = 0.15$. Тесных связей между индексом урожайности поколений и разными показателями температуры (как обобщенным, так и разрозненным по времени и пространству) не выявлено: коэффициент корреляции варьировал от 0.13 до 0.32. Однако при сопоставлении фрагментов наблюдаемого ряда была обнаружена тенденция, которая лучше всего проявилась при сравнении урожайности поколений с температурой в марте на самом юго-восточном квадрате (который географически можно отнести к восточной части зал. Петра Великого) (рис. 5). Весной здесь наблюдаются самые плотные скопления нерестового минтая (Нуждин, 1998). Коэффициент корреляции между указанными показателями в 1974–1989 гг. составил 0.58, а в 1990–2013 г. не превышал -0.02. Обратим внимание на то, что с 1988–1990 гг. коррелятивные связи между урожайностью поколений и температурными показателями всегда меняли знак. Коэффициенты корреляции до 1987–1989 гг. колебались в пределах 0.50–0.58,

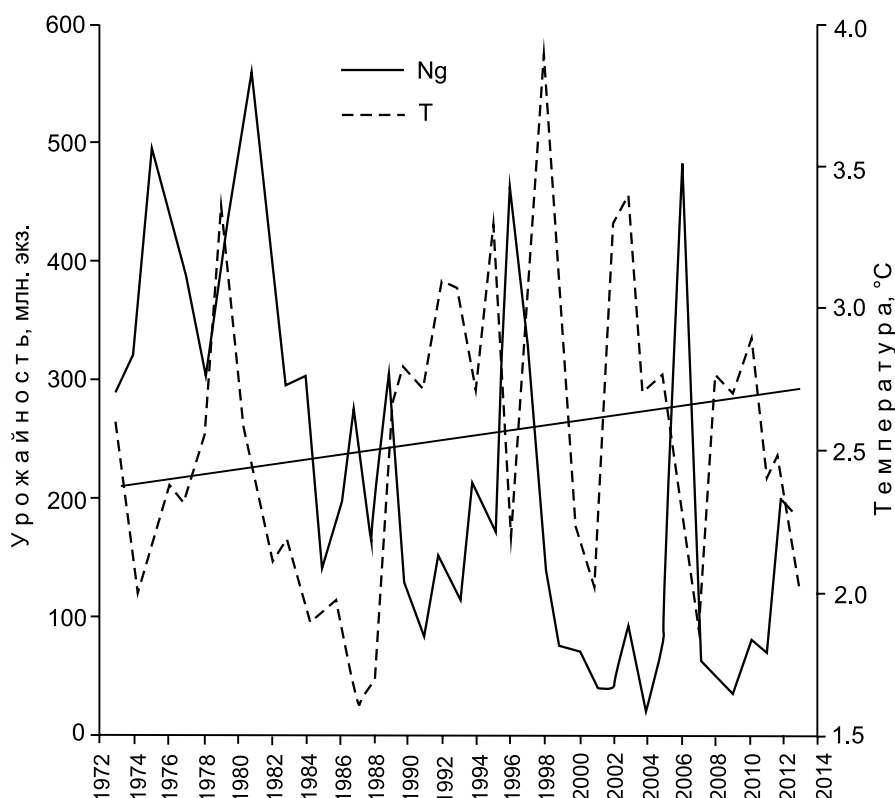


Рис. 5. Динамика индекса урожайности поколений (Ng) приморского минтая *Theragra chalcogramma* и температуры поверхностного слоя воды (T) в восточной части зал. Петра Великого в марте. Прямая линия – тренд повышения температуры.

а с 1988–1990 гг. варьировали от -0.02 до -0.29. Смена знака связи динамики численности с температурным фоном хорошо интерпретируется климатическим сдвигом, который обозначился в конце 1980-х годов (Зуенко и др., 2010).

При затруднении найти хорошо интерпретированную причинно-следственную связь между динамикой популяции и абиотическими факторами исследователи зачастую прибегают к помощи гипотезы "климатических циклов" численности (Шилов, 2001, и мн. др.). По мнению Максимова (1989), природный цикл – это понятие не климатологическое, а экологическое, так как включает не только климатические факторы, но и его последствия, а также реакцию популяций на них. Реакция разных поколений на одни и те же факторы может существенно различаться, поскольку существует генетическая дифференциация поколений (Тимофеев-Ресовский и др., 1977; Яблоков, 1987). При выявлении схожей периодичности биотических и абиотических процессов в "природных циклах" между ними не обязательно должна проявляться четкая количественная связь. Более того, когда "популяционные волны" сопровождаются флуктуациями, они выводят (хотя бы и временно) ряд мутаций и генотипов в другую констелляцию абиотической и биотической среды. "Популяционные волны" являются одним из факторов отбора, действие которого может быть различным для разных популяций одного и того же вида (Тимофеев-Ресовский и др., 1977). По мнению Никольского (1974), изменение численности популяций во многом определяется биотическими регуляторными механизмами.

Оценка латентных периодичностей урожайности поколений приморского минтая выполнена на основании представления выборочного распределения отрезком ряда Фурье. В вычислительных экспериментах полагали, что

выборочное распределение формируют гармоники диапазоном 5–14 лет. В среде MATLAB параметры разложения оценивались процедурой *fft* (Дьяконов, Круглов, 2002). Период основной несущей гармоники оказался равным девяти годам, что отражает биологическую особенность жизненного цикла минтая и хорошо интерпретируется. Эта гармоника использовалась для построения качественной прогностической модели (рис. 6). Девятилетняя продолжительность популяционного цикла соответствует периоду половозрелости одного поколения. Приморский минтай доживает до 12 лет, а половое созревание у него начинается на третьем году жизни (Вдовин и др., 2015). Следовательно, поколения, различающиеся на девять лет по возрасту, репродуктивно изолированы и могут иметь разный генетический облик.

Модельные результаты указывают на урожайность поколений 2014–2016 гг. Возможно, что вместо трех урожайных поколений возникнет одно, а урожайность следующего поколения будет намного ниже, что характерно для периода, начавшегося с 1990 г. Однако следует обратить внимание на то, что эмпирические пики урожайности в 2 раза превышают модельные. Поколение 2014 г. рождения, несомненно, проявит себя как высокоурожайное. В съёмке 2015 г. количество учтённых годовиков оказалось рекордным – 421 млн. экз. Предыдущая рекордная цифра (151 млн. экз. годовиков) была отмечена у высокоурожайного поколения 2006 г. рождения. В съёмке 2016 г. численность двухгодовиков составляла 166 млн. экз., что сопоставимо только с количеством учтенных двухгодовиков поколения 2006 г. – 171 млн. экз. Оценки численности годовиков и двухгодовиков поколения 2014 г. рождения превышали средние оценки в 23 и 4.8 раза соответственно. Оценить урожайность минтая поколения 2014 г. рождения пока невозможно. Логичнее

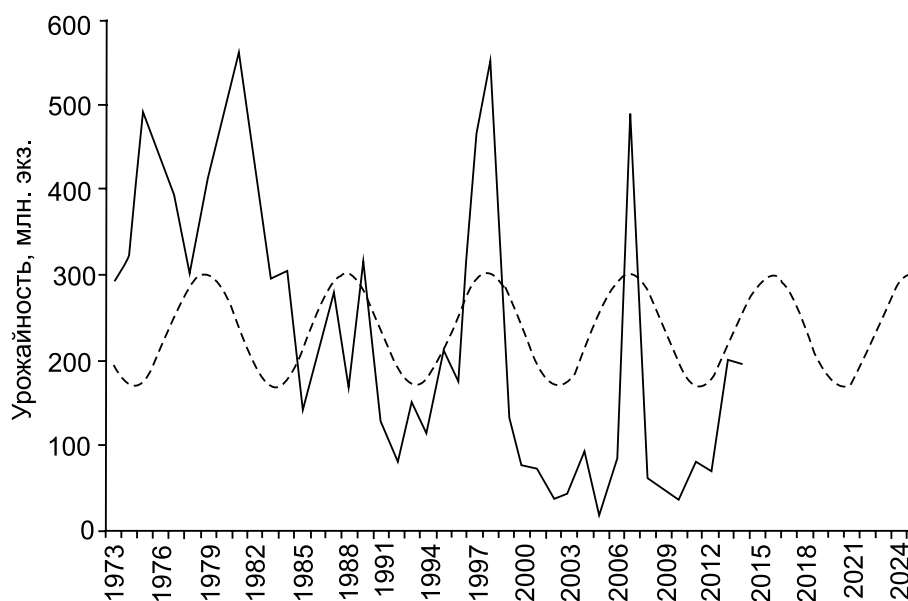


Рис. 6. Динамика индекса урожайности поколений приморского минтая *Theragra chalcogramma*. Здесь и на рис. 7: выборочные данные – сплошная линия, модель – пунктир.



Рис. 7. Динамика биомассы приморского минтая *Theragra chalcogramma*. Обозначения, как на рис. 6.

спрогнозировать величину его запасов на 2016–2023 гг., исходя из эмпирических данных 2007–2015 гг., модельных величин индекса урожайности поколений 2014–2020 гг. и усредненных данных по возрастному составу и средней массе возрастных групп. Результаты расчётов показывают в целом не большой рост запасов, который всё же превышает самый низкий уровень биомассы, отмеченный в 2006–2013 гг. (рис. 7). Ранее предполагали, что рост запасов приморского минтая, исходя из тенденций его динамики, начнется в 2016 г. (Вдовин, Соломатов, 2013). Максимальные величины биомассы ожидаются в 2019–2020 гг. Возможен и более благоприятный (для промысла) сценарий при отсутствии низкоурожайных поколений минтая в ближайшие годы. Однако имеющиеся данные пока не позволяют точно оценить состояние запасов на 7–8-летнюю перспективу: продлится ли современный период с невысоким уровнем запасов и значительными колебаниями численности или повторится ситуация 1978–1986 гг. с высоким и стабильным уровнем запасов. Прояснить данную ситуацию могут только последующие съёмки в течение двух–трёх лет.

Таким образом, биомасса приморского минтая в 1976–2015 гг. изменялась от 48 до 373 тыс. т, а численность — от 99 до 1115 млн. экз.; средние оценки составляли соответственно 185 тыс. т и 531 млн. экз. Самый высокий и стабильный уровень запасов отмечен в 1978–1986 гг. (средняя биомасса — 308 тыс. т). В динамике урожайности поколений чётко выделяется период 1973–1989 гг. с невысокой амплитудой колебаний урожайности (4 раза) и с высоким средним уровнем индекса урожайности (344 млн. экз.), а также период 1990–2013 гг., характеризующийся резкими колебаниями индекса урожайности

(в 37.9 раза) и снижением его среднего значения в 2.3 раза (152 млн. экз.). За время исследований выявлено четыре высокоурожайных поколения 1975, 1981, 1997 и 2006 гг. рождения с численностью рыб соответственно 494, 565, 554 и 491 млн. экз. Поколение 2006 г. не обеспечило значительного подъёма запасов, так как возникло на фоне смежных низкоурожайных поколений. Значение общей смертности у рыб старше 3+ колебалось от 0.52 до 0.89. Доля естественной смертности (от общей годовой) составила около 80%. Можно предположить, что колебания численности приморского минтая определяются естественными причинами. Связь родители–потомки у приморского минтая не прослеживается, как и у многих других популяций минтая. Нет явной связи между величиной смертности и урожайностью поколений. Биотические регуляторные механизмы пока неясны. Чётко проявляется только девятилетняя цикличность в динамике урожайности поколений, соответствующая продолжительности периода половозрелости.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Борец Л.А. Состав донных рыб на шельфе Охотского моря // Биол. моря. 1985. № 4. С. 54–59.
- Булатов О.А. Оценка нерестового запаса boreальных рыб ихтиопланктонным методом: Тез. докл. Всесоюз. школы "Технические средства и методы исследований Мирового океана". М.: Наука. 1987. Кн. 2. С. 5–6.
- Булатов О.А. Промысел и запасы минтая *Theragra chalcogramma*: возможна ли "турбулентность"? // Вопр. рыболовства. 2014. Т. 15, № 4. С. 350–390.
- Вдовин А.Н. Многофакторный анализ смертности южного однопёрного терпуга в водах Приморья // Изменчивость состава ихтиофауны, урожайности поколений и методы прогно-

- зирования запасов рыб в северной части Тихого океана. Владивосток: ТИНРО. 1988. С. 122–126.
- Вдовин А.Н. О возможности корректировки размерного и возрастного состава траловых уловов рыб // Рыб. хоз-во. 2011. № 6. С. 55–57.
- Вдовин А.Н., Антоненко Д.В. Состояние запасов пятнистого терпуга *Hexagrammos stelleri* в заливе Петра Великого // Вопр. ихтиологии. 2001. Т. 41, № 1. С. 56–61.
- Вдовин А.Н., Зуенко Ю.И. Вертикальная зональность и экологические группировки рыб залива Петра Великого // Изв. ТИНРО. 1997. Т. 122. С. 152–176.
- Вдовин А.Н., Нуждин В.А., Бойко М.И. Возрастная динамика полового состава приморского минтая *Theragra chalcogramma* (Японское море) // Вопр. рыболовства. 2015. Т. 16, № 3. С. 351–358.
- Вдовин А.Н., Соломатов С.Ф. Состояние и динамика запасов рыб в морских водах Приморья (Японское море) в 1983–2011 гг. // Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и северо-западной части Тихого океана: Сб. науч. тр. Камчат. НИИ рыб. хоз-ва и океанографии. 2013. Вып. 29. С. 92–103.
- Вдовин А.Н., Соломатов С.Ф., Зуенко Ю.И. Динамика численности японской камбалы *Pseudopleuronectes yokohamae* в заливе Петра Великого (Японское море) и факторы, её определяющие // Вопр. рыболовства. 2013. Т. 14, № 3(55). С. 450–459.
- Гаврилов Г.М. Состав, динамика численности и промысел рыб в экономической зоне России и прилегающих водах Японского моря // Изв. ТИНРО. 1998. Т. 124. С. 271–319.
- Гаврилов Г.М., Безлюдный А.М. Динамика численности минтая *Theragra chalcogramma* (Pallas) юго-западной части Японского моря // Тресковые дальневосточных морей. Владивосток: ТИНРО. 1986. С. 5–28.
- Гаврилов Г.М., Пушкарева Н.Ф., Стрельцов М.С. Состав и биомасса донных и придонных рыб экономической зоны СССР Японского моря // Изменчивость состава ихтиофауны, урожайности поколений и методы прогнозирования запасов рыб в северной части Тихого океана. Владивосток: ТИНРО. 1988. С. 37–55.
- Дьяконов В., Круглов В. MATLAB. Анализ, идентификация и моделирование систем. Специальный справочник. СПб.: Питер. 2002. 448 с.
- Зверькова Л.М. Минтай. Биология, состояние запасов. Владивосток: ТИНРО-центр. 2003. 248 с.
- Зуенко Ю.И., Черноиванова Л.А., Вдовин А.Н., Устинова Е.И. Влияние изменений климата на воспроизводство наваги *Eleginus gracilis* в заливе Петра Великого (Японское море) // Вопр. промысл. океанологии. 2010. Вып. 7, № 1. С. 132–144.
- Качина Т.Ф., Сергеева Н.П. Естественная смертность восточноохотоморского минтая *Theragra chalcogramma* (Pallas) (Gadidae) // Вопр. ихтиологии. 1984. Т. 24, вып. 3. С. 380–384.
- Кушинг Д.Х. Морская экология и рыболовство. М.: Пищ. пром-сть. 1979. 288 с.
- Максимов А.А. Природные циклы: причины повторяемости экологических процессов. Л.: Наука. 1989. 236 с.
- Никольский Г.В. Теория динамики стада рыб как биологическая основа рациональной эксплуатации и воспроизводства рыбных ресурсов. М.: Пищ. пром-сть. 1974. 447 с.
- Нуждин В.А. Минтай северо-западной части Японского моря – особенности биологии, размножения, промысел // Изв. ТИНРО. 1998. Т. 123. С. 53–73.
- Нуждин В.А. Биология и состояние запасов минтая *Theragra chalcogramma* в водах Приморья: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток: ТИНРО-центр. 2008. 24 с.
- Нуждин В.А. Популяционная плодовитость приморского минтая *Theragra chalcogramma* (Японское море) // Материалы Всероссийской научно-практ. конф. с международным участием, приуроченной к 145-летию Севастопольской биологической станции. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика. 2016. Т. 1. С. 231–234.
- Панченко В.В., Вдовин А.Н. Динамика численности снежного керчака *Myoxocephalus brandti* (Cottidae) в заливе Петра Великого (Японское море) // Вопр. ихтиологии. 2005. Т. 45, № 3. С. 389–394.
- Рикер У.Е. Методы оценки и интерпретация биологических показателей популяций рыб. М.: Пищ. пром-сть. 1979. 408 с.
- Тимофеев-Ресовский Н.В., Воронцов Н.Н., Яблоков А.В. Краткий очерк теории эволюции. М.: Наука. 1977. 297 с.
- Фадеев Н.С. Сроки размножения и нерестовых подходов минтая // Экология, запасы и промысел минтая. Владивосток: ТИНРО. 1981. С. 57–60.
- Фадеев Н.С. Методика оценки запасов минтая по численности икры и размерно-возрастному составу // Биол. моря. 1999. Т. 25, № 3. С. 246–249.
- Шилов И.А. Экология. М.: Высшая школа. 2001. 512 с.
- Шунтов В.П., Волков А.Ф., Темных О.С., Дулепова Е.П. Минтай в экосистемах дальневосточных морей. Владивосток: ТИНРО. 1993. 426 с.
- Яблоков А.В. Популяционная биология. М.: Высшая школа. 1987. 303 с.

РАННИЕ СТАДИИ РАЗВИТИЯ ХОХЛАТОЙ КАМБАЛЫ *SAMARIS CRISTATUS* GRAY, 1831 (PLEURONECTIFORMES: SAMARIDAE) ИЗ ЮЖНО-КИТАЙСКОГО МОРЯ, ИДЕНТИФИЦИРОВАННОЙ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ДНК-БАРКОДИНГА *

© 2017 А. М. Шадрин¹, М. В. Холодова², А. В. Семенова¹

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва 119992;

²Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва 117071
e-mail: shadrin-mail@mail.ru

Статья принята к печати 26.01.2017 г.

Представлена хронология развития и детально описана морфология яиц, эмбрионов, предличинок и ранних личинок хохлатой камбалы *Samaris cristatus*, полученных из ихтиопланктонных сборов и инкубированных в лабораторных условиях до стадии перехода на экзогенное питание при температуре около 24°C. Таксономическая идентификация проведена с помощью молекулярно-генетического метода ДНК-баркодинга на основании анализа нуклеотидной последовательности (сиквенса) первой субъединицы митохондриального гена цитохромоксидазы С (COI).

Ключевые слова: *Samaris cristatus*, Samaridae, икра, ранние личинки, ДНК-баркодинг, таксономическая идентификация.

Early developmental stages of the cockatoo flounder *Samaris cristatus* Gray, 1831 (Pleuronectiformes: Samaridae) from the South China Sea, identified using DNA barcoding. A. M. Shadrin¹, M. V. Kholodova², A. V. Semenova¹ (¹M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119992; ²A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow 117071)

Late embryonic and early larval development (until first feeding) of *Samaris cristatus* were studied. The chronology of development and a detailed morphological description of the eggs, embryos, prelarvae and early larvae are presented. The eggs of *S. cristatus* were obtained from ichthyoplankton catches, which were performed in the coastal waters of central Vietnam, and incubated under laboratory conditions at a temperature of about 24°C. The taxonomic identification was carried out by the method of DNA barcoding based on analysis of the nucleotide sequence of the mitochondrial cytochrome oxidase c subunit 1 (COI) gene. (Biologiya Morya, 2017, vol. 43, no. 5, pp. 329–334).

Keywords: *Samaris cristatus*, Samaridae, eggs, early larvae, DNA barcoding, taxonomic identification.

Таксономическая идентификация рыб на ранних стадиях развития является важнейшим компонентом большинства комплексных исследований морских экосистем. Она необходима при изучении жизненных циклов рыб, их миграций и зоогеографического распределения, при оценке состояния коралловых сообществ, экологическом мониторинге, прогнозировании численности хозяйственно-важных видов и т.д. Однако выполнение таких исследований сопряжено с большими сложностями, связанными, прежде всего, с недостатком данных по раннему онтогенезу рыб. К настоящему времени описано развитие лишь у небольшого числа видов рыб. Менее чем у 50% видов рыб, обитающих в Индо-Пацифике, описана, по крайней мере, одна личиночная стадия, и лишь для очень немногих видов рыб имеется более полное описание их развития. Гораздо заметнее недостаток информации о самых ранних личиночных стадиях. Определение видовой принадлежности икры и ранних личинок – ещё более сложная задача (Leis, 2015). Для большинства рыб

неизвестно строение яиц, для многих видов отсутствуют сведения даже о типе нереста. Наиболее прямым и информативным путем пополнения базы данных для таксономической идентификации рыб на ранних стадиях онтогенеза являются исследование и описание развития оплодотворенной икры, полученной от производителей конкретных видов. В то же время в большинстве случаев организовать и выполнить такие работы невозможно. Иногда более целесообразно получить эмбриологический материал из ихтиопланктонных сборов и инкубировать его в лабораторных условиях с последующим описанием фрагментов раннего онтогенеза у разных видов. Для таксономической идентификации изучаемых объектов наиболее подходящим является молекулярно-генетический метод ДНК-баркодинга, успешно применяемый в последнее время для решения подобных задач (Pegg et al., 2006; Richardson et al., 2007; Saitoh et al., 2009; Zemlak et al., 2009; Matarese et al., 2011; Thirumaraiselvi et al., 2015). Одна из конечных целей таких исследований – создание

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ "Научные основы создания национального банка депозитария живых систем" № 14-50-00029.

базы данных, пригодной для идентификации объектов ихтиофауны региона на ранних стадиях их развития.

Всё сказанное справедливо для *Samaris cristatus* – правосторонней хохлатой камбалы, или самариса хохлатого, распространенного в Западной Индо-Пацифике, в Красном море, от Восточной Африки до Новой Каледонии и от Австралии до Японии (FishBase, 2016). Это единственный из пяти видов рода *Samaris*, встречающийся в Южно-Китайском море (Alien et al., 2000). В связи с этим целью настоящей работы является описание раннего развития *S. cristatus*, идентифицированного с помощью метода ДНК-баркодинга.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа с эмбриологическим материалом

Исследования проводили с 1993 по 2015 г. на базе Приморского отделения Совместного российско-вьетнамского тропического научно-исследовательского и технологического центра (г. Нячанг, Вьетнам). Источником материала послужили ихтиопланктонные сборы, выполненные в центральной части проливов между островами Че и Мьеу, Че и Там, Че и Мот, а также между островами Мот и Мун в зал. Нячанг (Южно-Китайское море). Ловы производили с 5 до 8 ч в слое воды от 0 до 5 м над глубинами от 10 до 40 м, используя стандартную сеть Джеди с диаметром входного отверстия 36 см, посредством 30-минутной циркуляции. При каждом выходе в море выполняли три лова в разных точках залива. Продолжительность сезона работ составляла около 2 мес. В течение этого времени изучали материалы, собранные в результате 15–20 выходов в море. В указанные годы исследования проводили в основном в зимне-весенний период (февраль–май), в 2004–2012 гг. – дополнительно в сезон дождей (октябрь–декабрь). В 1993 г. пробы планктона отбирали также в августе–октябре, а в 2004 г. – в июне–июле.

Пробы доставляли в лабораторию в термостатируемых ёмкостях, концентрировали и извлекали из них живую икру рыб для последующей инкубации в искусственных условиях при температуре около 24°C и солёности 32–34‰. За время наблюдений было поймано и проинкубировано до разных стадий предличиночного или начала личиночного состояния 23 морфологически идентичных экземпляра. Большая часть материала была собрана в 2004–2013 гг. (12 экз.) и в 2014–2015 гг. (7 экз.). Наиболее детально изучено развитие семи экземпляров, пойманных в 2014 и 2015 гг. Фотоиллюстрации и хронологические характеристики развития, приведенные в настоящей работе, получены в результате изучения этих особей, 4 из которых в лабораторных условиях перешли в личиночное состояние. Одну из них использовали для молекулярно-генетического анализа. Измерения яиц, выполненные в разные сезоны в период сбора материала, представлены как выборочное среднее со стандартной ошибкой. В качестве размера предличинок и личинок использована полная длина (TL), представленная в виде диапазона, характерного для соответствующей стадии. Иллюстрации, измерения и морфологические описания стадий выполнены с использованием живого материала.

Молекулярно-генетическая идентификация образцов

Тотальную ДНК выделяли с помощью набора Diatom Prep 100 (Изоген, Россия) по протоколу производителя. Для видовой характеристики исследованного образца были получены нукле-

отидные последовательности первой субъединицы митохондриального гена цитохромоксидазы С (CO1), обычно используемого в качестве основного признака позвоночных животных в программе "баркодинг жизни". Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с праймерами, специально разработанными для амплификации CO1 рыб: FishF1–5'TCAACCAACCA-CAAAGACATTGGCAC3' (прямой) и FishR1–5'TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3' (обратный) (Ward et al., 2005). Амплификацию проводили в 20 мкл с использованием 4 мкл набора для ПЦР 5x Master Mix (Диалат, Россия) с добавлением полимеразы Smart TAQ (Диалат, Россия) в следующем режиме: I – 2 мин при температуре 95°C; II – 30 с при 94°C, 30 с при 54°C и 60 с при 72°C; III – 6 мин при температуре 72°C. Первичные последовательности нуклеотидов определяли методом автоматического секвенирования на генетическом анализаторе AB3130 (Applied Biosystems, США) с использованием набора Big Dye 3.1 (Applied Biosystems, США) с прямым и обратным праймерами. Правильность видовой идентификации оценивали путем сравнения полученной нуклеотидной последовательности с гомологичными сиквенсами из базы GenBank (алгоритм BLAST) (NCBI), а также из базы BOLD (The Barcode of Life Data System, www.barcodinglife.org).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Таксономическая идентификация объекта исследования

Для таксономической идентификации объекта исследования были получены нуклеотидные последовательности длиной 651 п.н. первой субъединицы гена CO1 мтДНК, используемые в ДНК-баркодинге. Полученный сиквенс депонирован в GenBank (№ KY405012). Их сравнение с гомологичными последовательностями из базы GenBank (NCBI) показало 98% сходство с характеристиками, полученными для *Samaris cristatus* из Южно-Китайского моря (№ KU945126, KU945125, KU945124) (Chang et al., 2016). Более информативным оказался сайт "баркодинг жизни" BOLD. Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности, полученной для исследованного нами вида рыб, с данными, приведенными на сайте www.barcodinglife.org, со 100% вероятностью подтвердил принадлежность изучаемого вида к роду *Samaris* и с уровнем сходства > 99% определил его видовую принадлежность как *S. cristatus*.

Морфологическое описание фрагмента раннего развития *S. cristatus*

Количество икры рыб в планктонных пробах, собранных в зал. Нячанг за период проведения работ, колебалось от 2 до более 4000 экз. на один лов. Икра *S. cristatus* в небольшом количестве (не более двух икринок в пробе) встречалась только в зимне-весенние сезоны. В августе–сентябре 1993 г. и в июне–июле 2004 г. икра этого вида в пробах отсутствовала. В некоторых пробах встречались немногочисленные яйца с морфологическими особенностями, характерными для изучаемого вида, но с мертвыми эмбрионами.

Икра *S. cristatus*, имеющая положительную плавучесть, при отсутствии турбулентного движения распо-

лагалась непосредственно под поверхностью воды. Диаметр икринки в среднем составлял 1.16 ± 0.01 мм (диапазон – 1.12–1.20 мм; $n = 16$). Яйцевая оболочка тонкая, прозрачная, с гладкой неструктурированной и слабо опалесцирующей внешней поверхностью, на которой имеется своеобразное массивное образование (рис. 1А–Г). В данном образовании просматривается определенная структурированность, включающая элемент, похожий на узкий канал, проходящий вдоль его центральной оси (рис. 1В). Желток однородный, несегментированный на гранулы, бесцветный, прозрачный, содержит одну почти бесцветную (с едва заметным желтоватым оттенком) жировую каплю диаметром от 0.12 до 0.13 мм. Ткани зародышей всех отловленных экземпляров были бесцветными. Ко времени проведения работ в лаборатории все яйца *S. cristatus* содержали эмбрионы, находившиеся на сходной стадии развития; их морфология соответствовала возрасту выделения в осевой мезодерме 10–15 пар сомитов.

Возраст ~ 40 ч до вылупления (рис. 1А, Б). В боковых закладках осевой мезодермы выделилось около 14 пар сомитов. Купферов пузырьки крупные, сферические. Произошла закладка обонятельных плакод, в слуховых и глазных плакодах начали формироваться полости. Пигментация отсутствует.

Возраст ~ 33 ч до вылупления (рис. 1Г). В теле зародыша выделилось около 23 пар сомитов, из них передние 18 приобрели V-образную форму. В головном мозге дифференцировались 4-й и 5-й мозговые пузыри; произошло подразделение заднего первичного отдела головного мозга на задний и продолговатый мозг. Задний мозг с хорошо

выраженным изгибом, верхняя часть которого преобразуется в мозжечок. Слуховые плакоды преобразовались в слуховые пузырьки. В глазных бокалах дифференцировались круглые хрусталики. Зародыш пигментирован. Меланофоры, содержащие коричневый пигмент, расположены на верхней стороне тела от передней границы заднего мозга до 20-го сегмента тела и на нижней части тела с 7–8-го по 19–20-й сегменты.

Возраст ~ 2 ч 30 мин после вылупления (ПВ) (рис. 1Д). Плавучесть вылупившихся предличинки слабо положительная, почти нейтральная. Предличинки малоподвижные и после редких бросков долго "парят" в толще воды. Их длина составляет 2.2–2.4 мм. В теле насчитывается 42–43 мускульных сегмента: 12–13 туловищных и 30–32 хвостовых. Жировая капля у разных особей шаровидная или слегка сдавленная в дорсовентральном направлении. Большая часть поверхности тела покрыта крупными выпуклыми клетками покровного слоя, или перидермы. На вершинах гребней большей части дорсальной и постанальной частей протоптеригия слой перидермы составлен из веретеновидно-игловатых клеток, формирующих в этих областях своеобразный пилообразный профиль. На уровне 3–5-го сегментов тела дифференцировались зачатки свободных лопастей грудных плавников. На уровне 4–6-го сегментов начинается формироваться изгиб кишечника. Пигментация представлена только коричневыми меланофорами, которые почти равномерно распределены на вентролатеральной поверхности желточного мешка, в районе перикардальной полости и на поверхности головного отдела. Некоторое увеличение концентрации пигментных клеток

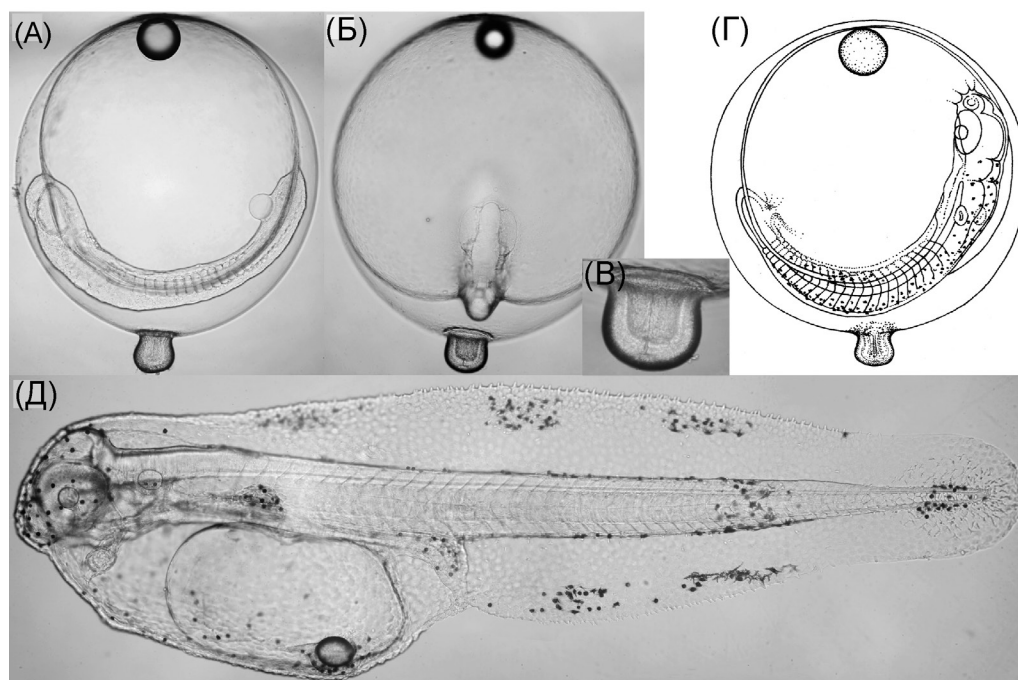


Рис. 1. Раннее развитие *Samaris cristatus*. А – эмбрион внутри яйцевой оболочки, 40 ч до вылупления (фото); Б – то же, вид головного отдела сверху (фото); В – участок яйцевой оболочки в области микропиле (фото); Г – эмбрион внутри яйцевой оболочки, 33 ч до вылупления (рисунок); Д – предличинка, 2 ч 30 мин после вылупления, размер – 2.2–2.4 мм (фото).

наблюдается на желточном мешке в области расположения жировой капли. По 10–15 меланофоров окрашивают каждый из зачатков свободных лопастей грудных плавников, несколько меланофоров располагается около каудальной части кишечной трубки, а также входит в состав непарных спинного и подхвостового пигментных рядов. После хорошо выраженного пояскового скопления в хвостовом отделе, расположенного с 20-го по 27–28-й сегмент, оба пигментных ряда прерываются. Несколько пигментных клеток имеется у задней части каудального отдела. Вверху спинной части протоптериgia на уровне 3–8-го, 14–18-го и 26–31-го сегментов тела сформировались пигментные скопления. Два скопления находятся внизу постанальной части протоптериgia на уровне 17–21-го и 27–35-го сегментов.

Возраст ~ 16 ч ПВ (рис. 2А). TL = 2.7–2.9 мм; в теле 41–43 мускульных сегмента: 11–12 туловищных и 30–31 хвостовой. Характеристики плавучести и поведение не изменились. Резорбировано 40–50% объема желтка, имевшегося в момент вылупления. Отдельные меланофоры из непарного спинного ряда сгруппировались в три относительно крупных пятна. Большая часть пигментных

клеток из непарного подхвостового ряда объединилась в одно пигментное пятно. В хвостовом отделе интенсивность пигментации в области пояскового скопления усилилась.

Возраст ~ 40 ч ПВ (рис. 2Б). Плавучесть предличинки слабо отрицательная, почти нейтральная. Через каждые 10–20 с предличинки делают короткий бросок, после которого "парят" в толще воды, не совершая активных движений и медленно опускаясь глубже. TL = 3.4–3.6 мм; в теле 41–42 мускульных сегмента: 11–12 туловищных и 30–31 хвостовой. Резорбировано более 90% объема желтка. Диаметр остатка жировой капли около 0.03 мм. Изгиб кишечника заметно увеличился и приобрел трехмерную конфигурацию. Кишка на уровне 5-го сегмента тела изгибается вниз, на уровне 7-го сегмента достигает нижнего положения и направляется вправо, вверх и назад. После 8–9-го сегментов кишка располагается горизонтально в верхней части полости тела и снова направляется вниз только в области её задней границы. Свободные лопасти зачатков грудных плавников располагаются в районе 2–3-го сегментов и ориентированы перпендикулярно латеральной поверхности тела; их основа-

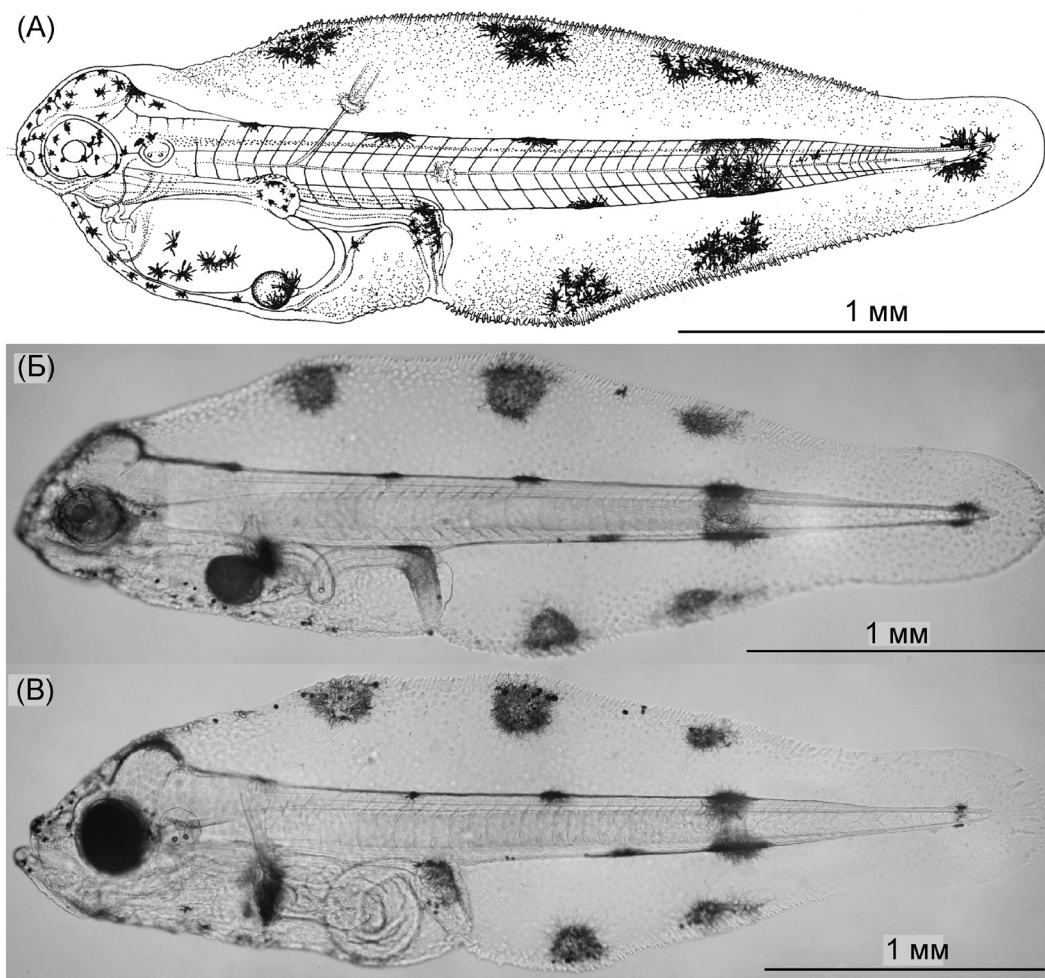


Рис. 2. Раннее развитие *Samariscristatus*. А – предличинка, ~16 ч после вылупления, размер – 2.2–2.4 мм (рисунок); Б – предличинка, 40 ч после вылупления, 2.7–2.9 мм (фото); В – предличинка, 63 ч после вылупления, 3.6–3.7 мм (фото).

ния перешли в вертикальное положение. Передняя часть зачатка печени охватывает каудальную область остатка желтка, а задняя примыкает к кишечной трубке вблизи начала её изгиба. Меланофоры, пигментировавшие зачатки грудных плавников, сконцентрированы в их основаниях. Глаза приобрели равномерную бледно-коричневую окраску, на фоне которой видны отдельные разветвленные и более интенсивно окрашенные меланофоры. Одиночные пигментные клетки располагаются на вентральной стороне тела от рыла до петли кишечника (~ 7 сегмент). На передней стороне головы над средним мозгом имеется их более плотное скопление. Основу пигментации составляют меланофоры коричневого цвета, среди которых выделяются отдельные клетки, содержащие чёрный меланин.

Возраст ~ 63 ч ПВ (рис. 2В). Переход в личиночное состояние. Длина личинки 3.6–3.7 мм; в теле 41–42 мускульных сегмента: 11 туловищных и 30–31 хвостовой. Движение личинок заметно усложнилось. Челюстной аппарат и грудные плавники приобрели подвижность. Личинки начали охотиться, выполняя сложные изгибы телом перед резкими бросками в сторону объекта питания. Желток полностью резорбирован. Основания свободных лопастей грудных плавников примкнули к сформировавшимся клейтрумам. Усложнилась дифференцировка пищеварительного тракта. Желудок обособился от пищевода и кишечника отчетливыми сужениями в местах перехода. Изгиб кишечника преобразовался в хорошо выраженную петлю. Его внутренняя поверхность приобрела характерную складчатую структуру. Меланиновая пигментация глаз в проходящем свете придает им абсолютно чёрную окраску, а гуаниновая пигментация проявляется металлическим блеском в отраженном свете.

ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень идентичности полученных сиквенсов COI с таковыми для *Samaris cristatus*, имеющимися в базе GenBank и BOLD (сходство более 98–99%), позволяет сделать вывод о том, что исследуемый образец представляет вид *S. cristatus*. Массивное образование, расположенное на поверхности яйцевой оболочки, встречается у рыб очень редко и является хорошим морфологическим признаком для идентификации яиц *S. cristatus*. Отмеченный в структуре этого выроста элемент, похожий на канал, очевидно, утолщение яйцевой оболочки вокруг микропиле. Ранее был представлен онтогенетический ряд, состоящий из яйца с таким же выростом на поверхности яйцевой оболочки и предличинки сразу после вылупления (Mito, 1963; Ikeda, Mito, 1988). Этот фрагмент развития был идентифицирован как относящийся к развитию представителя семейства Bothidae (Pleuronectiformes). Описанная в данных работах форма по размерным характеристикам яйца и предличинки, положению жировой капли и характеру пигментации эмбриона имела довольно высокое сходство с *S. cristatus*. Похожим было также распределение по телу предличинки отдельных пигментных

клеток и их небольших групп, но отчетливые скопления или крупные пятна с характерным для исследованного нами *S. cristatus* расположением отсутствовали. Возможно, что дифференцировка пигментации у предличинки ещё не завершилась, из-за более ранней стадии развития она имела немного меньший размер и больший объём желтка. Кроме этого выявлены некоторые отличия в сегментации: при совпадении числа туловищных сегментов хвостовых сегментов было на 7–8 меньше.

В работе Шао с соавторами (Shao et al., 2001) изображены яйца с таким же выростом на поверхности оболочки, как у *S. cristatus*, принадлежащие, вероятно, двум разным видам. Яйца несколько крупнее обнаруженных нами; в желтке первой формы жировые капли отсутствуют, а в желтке второй формы их около 25. Для первой формы личиночные стадии не изображены; ранняя предличинка второй формы имеет почти детальное сходство с *S. cristatus* в распределении пигментных клеток, но цвет пигмента не коричневый, а ярко-желтый. В работе Коннелла (Connell, 2012) представлен довольно продолжительный онтогенетический ряд вида, также имеющего вырост на поверхности яйцевой оболочки. Основные характеристики яйца и распределение пигмента на личинках разного возраста практически полностью совпадают с описанием *S. cristatus*, но в отношении цвета основного пигмента, который автор называет белым, остается некоторая неясность, возникающая, возможно, из-за фотосъёмки объекта в отраженном свете. В работах Шао с соавторами (Shao et al., 2001) и Коннелла (Connell, 2012) не уделено достаточного внимания размерным и морфологическим признакам стадий развития объектов с характерным выростом на поверхности яйцевой оболочки. Однако имеющиеся сведения говорят как об очевидном значительном сходстве, так и о некоторых чертах различия между формами, представленными в данных работах, и описанным нами *S. cristatus*. Это позволяет предположить, что речь идет о двух–трех относительно близких по таксономическому положению видах. Шао с соавторами (Shao et al., 2001) и Коннелл (Connell, 2012), ориентируясь на работу Мито (Mito, 1963), идентифицировали все формы с хорошо выраженным выростом на яйцевой оболочке как виды семейства Bothidae. При этом Коннелл (Connell, 2012) отнес изучаемый вид к данному семейству лишь условно, так как по результатам молекулярно-генетического анализа он далек от всех известных представителей Bothidae, обитающих в районе проведения работ. Только позже (Steinke et al., 2016) форма была определена как *S. cristatus*. В исследовании Коннелла (Connell, 2012) описаны яйца ещё четырёх представителей ботид, яйцевые оболочки которых гладкие, а эмбрионы и личинки по морфологии и пигментации заметно отличаются от таковых *S. cristatus* и других известных представителей ихтиофауны, яйца которых имеют характерный вырост на поверхности оболочки. Исходя из этого, можно предположить, что определение Мито (Mito, 1963) было ошибочным. Морфологические характеристики ранних ста-

дий Bothidae, идентифицированных Коннеллом (Connell, 2012), позволяют заключить, что наличие отмеченной особенности строения оболочки не является их общим признаком. К тому же пока нет достоверной информации о наличии у каких-либо представителей этого семейства таких яйцевых оболочек. Обладая данными по строению яиц только одного представителя рода *Samaris*, невозможно утверждать, что вырост на оболочке является особенностью всех представителей рода и тем более семейства Samaridae.

Пойманные в процессе работ особи с характерным выростом вокруг микропиле на всех исследованных стадиях морфологически не различались, что, несмотря на неабсолютную уникальность признака, связанного с особенностями строения яйцевой оболочки *S. cristatus*, говорит о том, что они являются представителями одного и того же вида. Их личинки сходны с более старшими личинками (размер 3.6 и 6.8 мм; фиксированный материал) представителей рода *Samaris* (Bray et al., 2000) как по сегментной формуле тела (35–42: 8–14 + 22–36), так и по наличию и расположению основных характерных пигментных скоплений.

Таким образом, детальное морфологическое описание позднего эмбрионального и раннего личиночного развития *S. cristatus*, таксономическая идентификация которого проведена с помощью молекулярно-генетического метода ДНК-баркодинга, согласуется с имеющимися в литературе морфологическими и зоогеографическими данными.

Авторы благодарны дирекции и сотрудникам Приморского отделения Совместного российско-вьетнамского тропического научно-исследовательского и технологического центра Хай Тань Нгуен и Льюнг Тхи Бик Туан за помощь в организации и проведении исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Alien G.R., Amaoka K., Anderson W.D. Jr. et al. A checklist of the fishes of the South China Sea // Raffles Bull. Zool. Suppl. 2000. No. 8. P. 569–667.
- Bray D.J., Leis J.M., Trnski T. Samaridae // The larvae of Indo-Pacific coastal fishes: a guide to identification. Fauna Malesiana Handbook. Leiden: Brill. 2000. Vol. 2. P. 740–744.
- Chang C.H., Shao K.T., Lin H.Y. et al. DNA barcodes of the native ray-finned fishes in Taiwan // Mol. Ecol. Resour. 2016. doi: 10.1111/1755-0998.12601
- Connell A.D. Marine fish eggs and larvae from the east coast of South Africa. 2012. <http://www.fisheggssandlarvae.com>
- FishBase / Ed.R. Froese, D. Pauly. 2016. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org. Version 10/2016.
- Ikeda T., Mito S. Pelagic fish eggs // An atlas of the early stage fishes in Japan. Tokyo: Tokai Univ. Press. 1988. P. 999–1083.
- Leis J.M. Taxonomy and systematics of larval Indo-Pacific fishes: a review of progress since 1981 // Ichthyol. Res. 2015. Vol. 62, no. 1. P. 9–28.
- Matarese A.C., Spies I.B., Busby M.S., Orr J.W. Early larvae of *Zesticelus profundorum* (family Cottidae) identified using DNA barcoding // Ichthyol. Res. 2011. Vol. 58, no. 2. P. 170–174.
- Mito S. Pelagic fish eggs from Japanese waters – III. Percina, VIII. Cottina, IX Echeineida and Pleuronectida // Jpn. J. Ichthyol. 1963. Vol. 11. P. 39–102.
- Pegg G.G., Sinclair B., Briskey L., Aspden W.J. MtDNA barcode identification of fish larvae in the southern Great Barrier Reef, Australia // Sci. Mar. 2006. Vol. 70, no. 2. P. 7–12.
- Richardson D.E., Vanwyke J.D., Exum A.M. et al. High-throughput species identification: from DNA isolation to bioinformatics // Mol. Ecol. Notes. 2007. Vol. 7. P. 199–207.
- Saitoh K., Uehara S., Tega T. Genetic identification of fish eggs collected in Sendai Bay and off Johban, Japan // Ichthyol. Res. 2009. Vol. 56. P. 200–203.
- Shao K.T., Yang R.S., Chen K.C., Lee Y.S. An identification guide of marine fish eggs from Taiwan. Institute of Zoology, Academia Sinica. 2001. 176 p. http://fishdb.sinica.edu.tw/chi/fishegg/fisheggintro_e.php
- Steinke D., Connell A.D., Hebert P.D.N. Linking adults and immatures of South African marine fishes // Genome. 2016. Vol. 59, no. 11. P. 959–967.
- Thirumaraiselvi R., Sourin D.A.S., Ramanadevi V., Thangaraj M. MtDNA barcode identification of finfish larvae from Vellar estuary, Tamilnadu, India // Not. Sci. Biol. 2015. Vol. 7. P. 16. doi: 10.15835/nsb.7.1.9478
- Ward R.D., Zemlak T.C., Innes B.H. et al. DNA barcoding Australia's fish species // Phil. Trans. Roy. Soc. London. B. 2005. Vol. 360. P. 1847–1857. doi: 10.1098/rstb.2005.1716
- Zemlak T.S., Ward R.D., Connell A. et al. DNA barcoding reveals overlooked marine fishes // Mol. Ecol. Resour. 2009. Vol. 9, suppl. 1. P. 237–242. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02649.x

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ ЭРИТРОЦИТОВ МОРСКОГО ЕРША *SCORPAENA PORCUS* LINNAEUS, 1758 (SCORPAENIFORMIS: SCORPAENIDAE) В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ*

© 2017 А. А. Солдатов^{1,2}, Т. А. Кухарева¹, А. Ю. Андреева¹, И. А. Парфенова²,
В. Н. Рычкова¹, Д. С. Зинькова²

¹Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН, Севастополь 299011;

²Севастопольский государственный университет, Севастополь 299053

e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Статья принята к печати 29.09.2016 г.

В эксперименте *in vivo* исследовано влияние гипоксии на морфометрические характеристики циркулирующих эритроцитов скорпены *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758. При 4-часовой адаптации рыб к условиям ранжированной гипоксии у эритроцитов наблюдался ряд последовательных реакций. При концентрации кислорода 2.6 мг/л (30% насыщения) объём и площадь поверхности клеток уменьшались на 4–5% ($p < 0.001$), а при концентрации 1.3 мг/л (15% насыщения) увеличивались на 4% ($p < 0.001$) по сравнению с контрольными значениями (нормоксия – 7–8 мг/л). Данная реакция эритроцитов количественно и качественно (порядок событий) совпадала с результатами экспериментов, выполненных нами ранее в условиях *in vitro*. Сделан вывод, что организм толерантной к гипоксии скорпены в условиях дефицита кислорода допускает автономное функционирование эритроцитов.

Ключевые слова: эритроциты, морфометрия клеток, гипоксия, *Scorpaena porcus*.

Functional morphology of erythrocytes of the black scorpionfish *Scorpaena porcus* (Linnaeus, 1758) (Scorpaeniformis: Scorpaenidae) at hypoxia. A. A. Soldatov^{1,2}, T. A. Kukhareva¹, A. Yu. Andreeva¹, I. A. Parfenova², V. N. Rychkova¹, D. S. Zin'kova² (¹Kovalevsky Institute of Marine Biological Research, Russian Academy of Sciences, Sevastopol 299011; ²Sevastopol State University, Sevastopol 299053)

The influence of hypoxia on the morphological characteristics of circulating erythrocytes of the black scorpion fish *Scorpaena porcus* (Linnaeus, 1758) has been investigated in an experiment *in vivo*. At 4-hour adaptation of the fish to the conditions of ranked hypoxia, their erythrocytes demonstrated a number of consecutive reactions. The volume and the surface area of the red blood cells reduced by 4–5% ($p < 0.001$) at oxygen concentration of 2.6 mg/l (30% saturation of water with oxygen) and increased by 4% ($p < 0.001$) at a concentration of 1.3 mg/l (15% saturation), relative to the control values (normoxia – 7–8 mg/l). The observed reaction of erythrocytes coincided quantitatively and qualitatively (the order of events) with the results of the experiments performed by us previously *in vitro*. Our study has shown that the organism of the black scorpion fish is tolerant to hypoxia and allows autonomous functioning of red blood cells under conditions of oxygen deficit. (Biologiya Morya, 2017, vol. 43, no. 5, pp. 335–340).

Keywords: erythrocytes, morphometry of cells, hypoxia, *Scorpaena porcus*.

Гипоксические зоны достаточно широко представлены в водах Мирового океана (Levin, 2002; Middelburg, Levin, 2009; Gewin, 2010). Концентрация кислорода в этих зонах обычно не превышает 0.5 мг/л (6–7% насыщения) (Levin, 2002; Stoeck et al., 2003). Особый интерес представляют организмы, образующие здесь относительно устойчивые скопления и реализующие в данных условиях полный жизненный цикл или его значительную часть. У обитателей таких зон происходит реорганизация метаболических процессов, направленная на оптимизацию энергетических трат (Hochachka, Somero, 2002; Gewin, 2010). Организация дыхательной цепи митохондрий приобретает некомпенсированный характер (Савина, 1992). В тканях гидробионтов повышается содержание аланина и сукцината (Van Waarde, 1988), растёт продукция NH_4^+ (Chew et al., 2005), увеличивается активность аминотран-

сфераз и активизируются процессы переаминирования аминокислот (Mommensen et al., 1980; Soldatov et al., 2010).

В ряде исследований значительное внимание уделено системам кислородного обеспечения, в частности, коррекции респираторной функции крови при дефиците кислорода (Soldatov et al., 2004, и др.). Показано, что зрелые эритроциты толерантных к гипоксии рыб в условиях гипоксии способны к сбалансированному угнетению мембранных и метаболических функций (Soldatov, 2005; Soldatov et al., 2014). При этом наблюдаются характерные морфологические изменения клеток, повышается их деформируемость (Gilles, Motais, 1989). В большинстве работ отмечено увеличение объёма клеток (Jensen, 2004; Wells, 2009, и др.). Процесс контролируется катехоламинами (Perry et al., 1999), взаимодействующими с поверхностными β -адренорецепторами эритроцитов (Reid,

*Работа поддержана грантом РФФИ (проект № 16-04-00135).

Perry, 1995) и активирующими антипорты клеток Na^+/H^+ и $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ (Wood, Simmons, 1994; Jensen, 2004). Действие катехоламинов опосредуется через cAMP (Gilles, Motaïs, 1989). Общее назначение процесса – контроль величины внутриклеточной pH и параметров сродства гемоглобина к кислороду.

Определенная закономерность в реакциях на гипоксию отмечена у эритроцитов рыб в условиях *in vitro* (Андреева, Солдатов, 2012). Показано, что умеренные формы гипоксии (2.0–4.0 мг O_2 /л) сопровождаются уменьшением объема клеток при одновременном росте их удельной поверхности, что можно рассматривать как компенсационную реакцию. И только экстремальные формы гипоксии (0.5–2.0 мг O_2 /л) сопровождаются набуханием эритроцитов. Это означает, что организм видов, толерантных к гипоксии, может допускать автономное функционирование клеточных систем. Данное положение требует экспериментальной проверки.

Цель настоящей работы – изучение морфометрических характеристик циркулирующих эритроцитов у *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 в условиях экспериментальной гипоксии (*in vivo*) и сопоставление результатов с данными, полученными нами ранее в условиях *in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа выполнена на взрослых особях скорпены *Scorpaena porcus* в состоянии относительного физиологического покоя (III–IV стадия зрелости гонад): длина тела – 14–17 см, масса тела – 85–115 г. Рыб отлавливали при помощи ставного невода и доставляли в лабораторию в пластиковых баках объемом 60 л с принудительной аэрацией. Транспортировка длилась не более трех часов. Концентрация кислорода в воде в момент отлова рыб составляла 7–8 мг/л. После отлова рыб помещали в аквариумы с естественным протоком морской воды, где их выдерживали в течение одной недели, чтобы снять стресс. Скорпен кормили фаршем из малоценных видов рыб; суточный пищевой рацион составлял 6–7% от массы тела. В опытах использовали подвижных активно питающихся рыб.

Экспериментальная часть работы выполнена с применением специально разработанного стенда, который позволяет поддерживать требуемую концентрацию кислорода в воде и определенную температуру в течение неограниченного периода времени. Температура воды в рабочей камере составляла 14–16°C. Фотопериод: 12 ч день – 12 ч ночь. После адаптации рыб к этим условиям в течение суток содержание кислорода в воде снижали за 2.5–3.0 ч с 8.5–8.7 мг/л (100% насыщения, контроль) до 2.6 мг/л (30% насыщения, опыт), а затем до 1.3 мг/л (15% насыщения, опыт) прокачиванием азота. Экспозиция при каждой концентрации составляла 4 ч. Содержание кислорода в воде контролировали потенциометрически. В работе использовали оксиметр ELWRO PRL T N5221 (Poland).

Кровь получали пункцией хвостовой артерии рыб. В качестве антикоагулянта применяли гепарин ("Рихтер", Венгрия). Образцы крови помещали в пластиковую пробирку объемом 0.5 мл. Изготавливали мазки крови, которые окрашивали по комбинированному методу Паппенгейма (Май-Грюнвальд + Романовский-Гимза) (Золотницкая, 1987). В работе использовали светооптический микроскоп "Биолар" (Польша), оборудованный камерой Olympus C-7070.

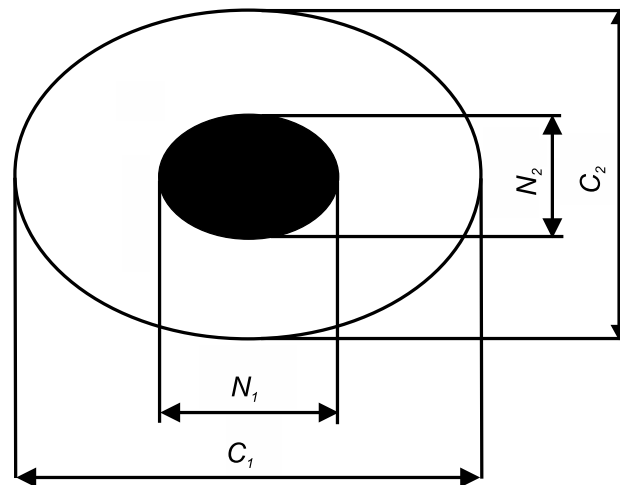


Рис. 1. Схема измерения ядерных эритроцитов. C_1 – продольная ось клетки, C_2 – поперечная ось клетки, N_1 – продольная ось ядра, N_2 – поперечная ось ядра.

Линейные размеры клеток крови определяли по фотографиям с помощью компьютерной программы ImageJ 1.44r (Girish, Vijayalakshmi, 2004). Измеряли большую и малую оси клетки (C_1 и C_2) и их ядра (N_1 и N_2) (рис. 1). На основании измерений оценивали объем клетки (V_c) с учетом объема ядра (V_n) (Ташкэ, 1980) и её толщины (h) (Чижевский, 1959) по уравнению (Houchin et al., 1958):

$$V_c = 0.7012 \left(\frac{C_1 + C_2}{2} \right)^2 h + V_n,$$

где $V_n = \frac{\pi N_1 N_2^2}{6}$ и $h = 1.8 + 0.0915(C_1 - 7.5)$.

Наряду с этим рассчитывали площадь поверхности клетки (S_c) (Houchin et al., 1958; Ташкэ, 1980):

$$S_c = 2\pi a^2 b + \frac{2\pi ab \sin(h^{-1}e)}{e},$$

где e , a , b – расчётные коэффициенты: $e = \frac{\sqrt{a^2 - b^2}}{a}$; $a = \frac{C_1 + C_2}{4}$; $b = 0.67h$.

На основании значений V_c , V_n и S_c определяли величину ядерно-плазматического отношения (NCR):

$$NCR = \frac{V_c}{V_n}$$

и удельную поверхность эритроцитов (SS_c):

$$SS_c = \frac{S_c}{V_c}.$$

Статистическая обработка и графическое оформление полученных результатов выполнены с применением стандартного пакета Grapher (версия 7). Результаты представлены в виде средней $\pm$ стандартная ошибка средней ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$). Достоверность различий оценивали при помощи t-критерия Стьюдента. О нормальности распределения судили по критерию Пирсона. Объем выборочных совокупностей составлял 7–11 особей на точку. Число измеренных клеток – 400–900 единиц на препарат (мазок крови). При оценке зависимости V_c от C_1 и C_2 использовали уравнение линейной функции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Понижение концентрации кислорода в воде с 8.5–8.7 до 2.6 мг/л (30% насыщения) приводило к уменьше-

нию среднеклеточного объёма зрелых эритроцитов (V_c) скорпены на 4–5% ($p < 0.001$) (рис. 2). При более глубокой гипоксии (1.3 мг/л, 15% насыщения) наблюдали прямо противоположные изменения: объём клеток относительно контрольных значений повышался на 4% ($p < 0.001$). По сравнению с результатами, полученными при концентрации кислорода 2.6 мг/л, рост объёма клеток был ещё более выражен и достигал почти 9% ($p < 0.001$). Эти результаты совпали с данными, полученными ранее в условиях экспериментов *in vitro*: при гипоксии до 2 мг/л объём клеток снижался на 2–5%, а при гипоксии ниже 2 мг/л, напротив, увеличивался на 3–12% (Андреева, Солдатов, 2012).

Сходные изменения в условиях экспериментальной гипоксии (*in vivo*) отмечены и для площади поверхности (S_c) циркулирующих эритроцитов (рис. 2). У контрольной группы рыб этот показатель составлял 379.6 ± 1.9 мкм². При понижении концентрации кислорода до 2.6 мг/л S_c уменьшалась на 4% ($p < 0.001$), а при концентрации 1.3 мг/л, напротив, увеличивалась на 9% ($p < 0.001$), достигая максимальных значений: 270.4 ± 1.7 мкм².

Характер изменения NCR и SS_c был несколько иным. Эти показатели несколько повышались по мере снижения

концентрации кислорода в воде (рис. 2). Увеличение NCR в основном определялось ростом объёма клеток, так как объём их ядер не изменялся и составлял 40–42 мкм³. Изменение SS_c было незначительным и не превышало 1% относительно контрольных значений.

Эритроциты рыб являются эллипсоидными клетками. Поэтому при изменении их V_c и S_c могут быть задействованы три переменные: продольная (C_1) и поперечная (C_2) оси и толщина (h) (рис. 1). Толщину мы исключили из рассмотрения, так как она является расчётной величиной и определяется по формуле (Чижевский, 1959), исходя из значений C_1 . Анализ корреляционных связей между V_n и осями клетки (C_1 и C_2) показал (рис. 3), что объём клетки лучше коррелирует с C_1 , чем с C_2 : коэффициент детерминации (R^2) изменялся в пределах 0.527–0.691. При этом гипоксия не влияла на характер связи. Полученные значения R^2 близки к таковым в контрольной группе. Для C_2 они существенно ниже ($R^2 = 0.119$ –0.292).

Случаи набухания (swelling) зрелых эритроцитов в условиях внешней гипоксии впервые в условиях *in vivo* были показаны для радужной форели *Salmo gairdneri* (см.: Nikinmaa, 1986). Позже подобную реакцию наблюдали и у других видов лососей (Ferguson, Boutilier,

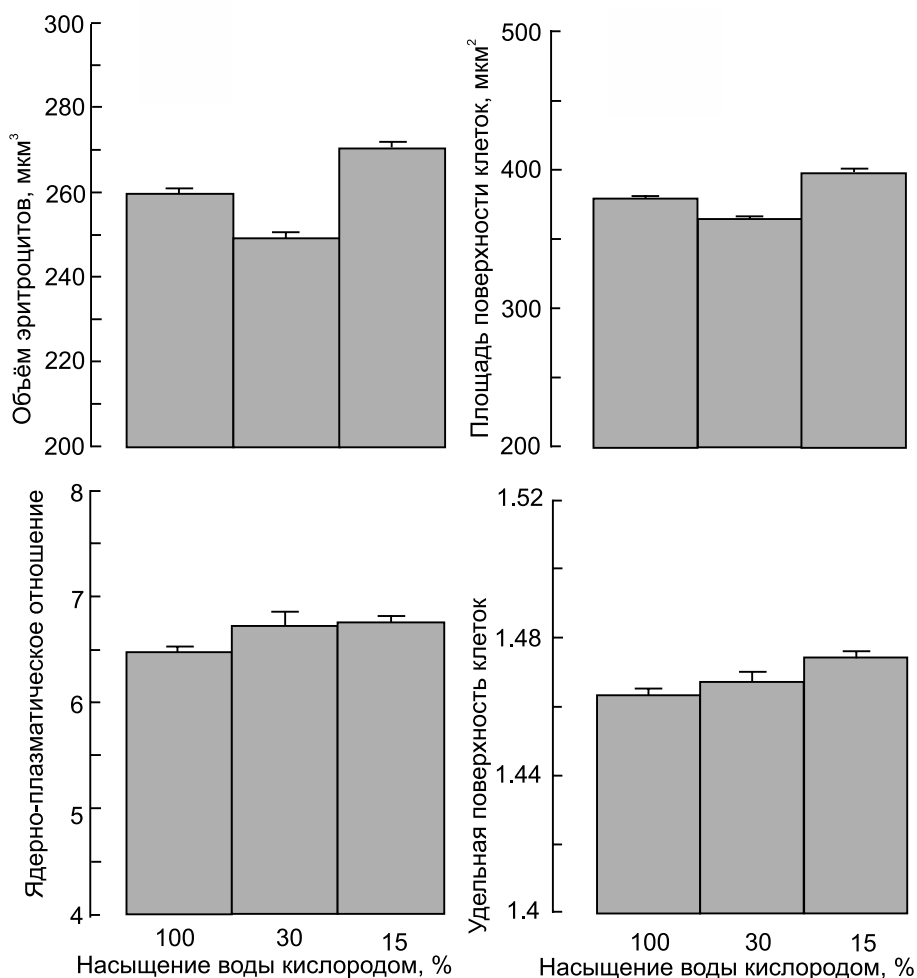


Рис. 2. Морфометрические характеристики циркулирующих эритроцитов в условиях нормоксии и гипоксии. Вертикальные линии – стандартная ошибка.

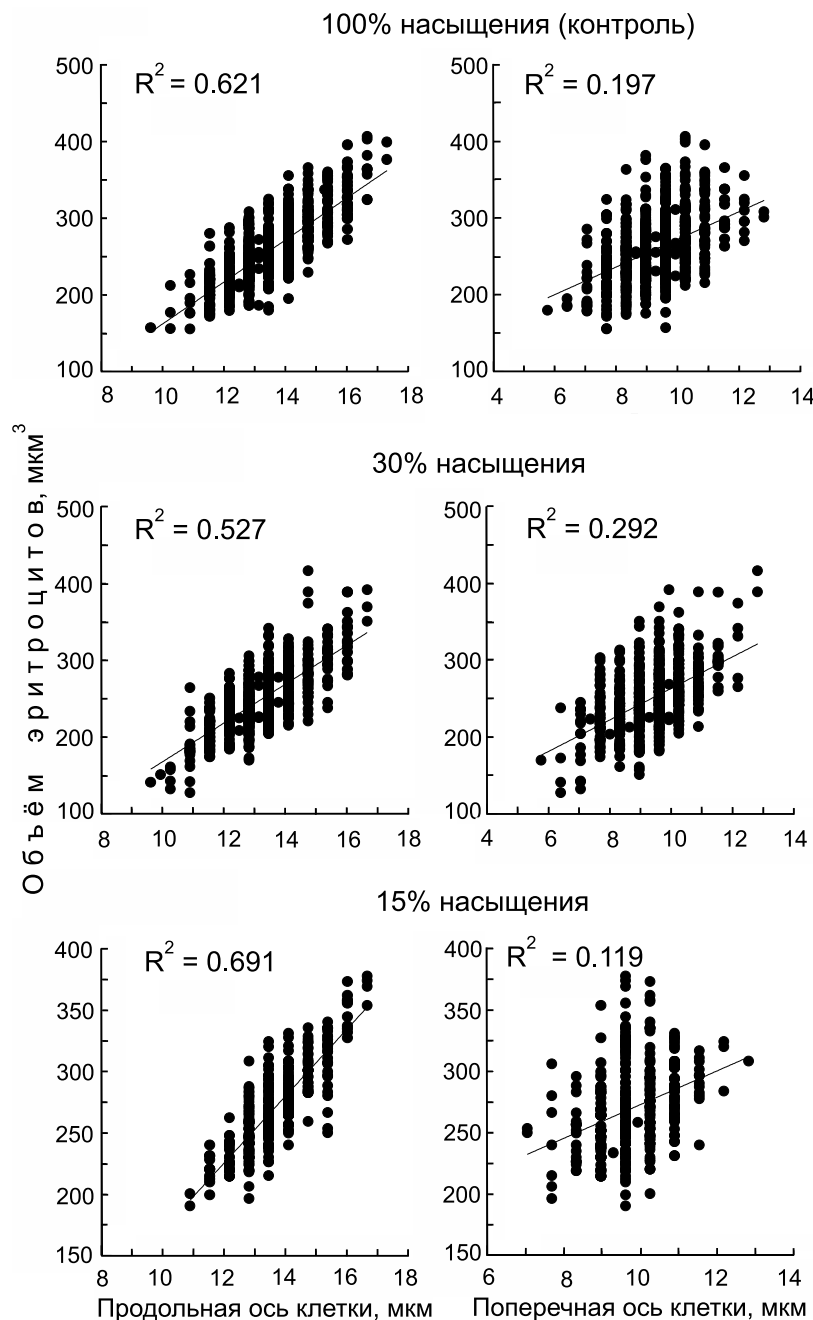


Рис. 3. Корреляционные отношения между объёмом эритроцитов и их линейными характеристиками в эксперименте. R^2 – коэффициент детерминации.

1988; Perry, Wood, 1989; Crocker, Cech, 1998), многие *Lampetra fluviatilis* (см.: Tufts, 1992) и у некоторых видов амазонских рыб (Val et al., 1997). Принято считать, что в её основе лежит рост содержания катехоламинов (адреналина, норадреналина) в крови, которые связываются с β -адренорецепторами мембран эритроцитов и индуцируют работу Na^+/H^+ антипорта (Nikinmaa, 1991; Jensen, 2004). Приток Na^+ и выход H^+ имеет два важных следствия для клетки: набухание и коррекция величины рН цитоплазмы. Последнее важно для сохранения положения кривой диссоциации оксигемоглобина (Nikinmaa, 1991; Jensen, 2004).

Необходимо отметить, что рост содержания катехоламинов в крови рыб в условиях гипоксии скорее отражает развитие состояния стресса, нежели является реакцией компенсаторного порядка. Перечисленные виды рыб в основном относятся к типично оксифильной группе, и гипоксия для них, очевидно, стрессорный, а не нормальный фактор. Виды, толерантные к экстремально низким концентрациям кислорода, к которым относится и скorpion, в большинстве своём являются типичными конформерами. Они допускают значительные изменения параметров внутренней среды и при этом сохраняют автономность в реакциях клеточных систем. В нашем слу-

чае эритроциты циркулирующей крови скорпены в условиях *in vivo* реагировали на внешнюю гипоксию, как и *in vitro* (Андреева, Солдатов, 2012). Отметим, что реакции совпали не только качественно (порядок событий), но и количественно. При этом набуханию клеток предшествовало уменьшение клеточного объема, что ранее было отмечено нами только в условиях *in vitro*.

В основе анализируемых процессов, по-видимому, лежит изменение внутриклеточной pH. В условиях гипоксии при активизации анаэробных процессов из клетки удаляется значительное количество протонов. Известно, что буферная ёмкость цитоплазмы эритроцитов рыб низкая (Adragna et al., 2004). Постепенное снижение pH может последовательно активизировать K^+/Cl^- -котранспорт, который сопровождается выходом осмолитов и приводит к уменьшению объема клеток при умеренном снижении pH (Jensen, 1995), и Na^+/H^+ -антипорт, при значительном уменьшении pH приводящий к увеличению объема клеток, причем данная реакция развивается без присутствия катехоламинов (Motais et al., 1992). Эта гипотеза была высказана нами ранее (Андреева, Солдатов, 2012). Для её проверки необходимо использовать проточную цитометрию и специальные флуорохромы для контроля внутриклеточной pH.

Таким образом, в условиях 4-часовой адаптации особей скорпены к условиям ранжированной гипоксии у циркулирующих эритроцитов наблюдается ряд последовательных реакций. При концентрации кислорода 2.6 мг/л (30% насыщения) объем и площадь поверхности клеток уменьшаются на 4–5%, а при концентрации 1.3 мг/л (15% насыщения) они увеличиваются на 4% относительно контрольных значений (нормоксия – 7–8 мг/л). Данные изменения количественно и качественно совпадают с результатами экспериментов, выполненных в условиях *in vitro*. Это означает, что организм толерантной к гипоксии скорпены в условиях дефицита кислорода допускает автономное функционирование эритроцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреева А.Ю., Солдатов А.А. Изменение объема ядерных эритроцитов скорпены в условиях внешней гипоксии (эксперименты *in vitro*) // Доп. НАН України. 2012. № 10. С. 149–153.
- Золотницкая Р.П. Методы гематологических исследований // Лабораторные методы исследования в клинике: справочник. М.: Медицина. 1987. С. 106–148.
- Савина М.В. Механизмы адаптации тканевого дыхания в эволюции позвоночных. М.: Наука. 1992. 200 с.
- Ташкэ К. Введение в количественную цитологическую морфологию. Бухарест: Изд-во Акад. Республики Румынии. 1980. 291 с.
- Чижевский А.Л. Структурный анализ движущейся крови. М.: Изд-во АН СССР. 1959. 474 с.
- Adragna N.C., Di Fulvio M., Lauf P.K. Regulation of $K-Cl$ cotransport: from function to genes // J. Membr. Biol. 2004. Vol. 201, no. 3. P. 109–137.
- Chew S.F., Gan J., Ip Y.K. Nitrogen metabolism and excretion in the swamp eel, *Monopterus albus*, during 6 or 40 days of estivation in mud // Physiol. Biochem. Zool. 2005. Vol. 78, no. 4. P. 620–629.
- Crocker C.E., Cech J.J. Effects of hypercapnia on blood-gas and acid-base status in the white sturgeon, *Acipenser transmontanus* // J. Comp. Physiol. B. 1998. Vol. 168, no. 1. P. 50–60.
- Ferguson R.A., Boutilier R.G. Metabolic energy production during adrenergic pH regulation in red cells of the Atlantic salmon, *Salmo salar* // Respir. Physiol. 1988. Vol. 74, no. 1. P. 65–76.
- Gewin V. Dead in the water // Nature. 2010. Vol. 466, no. 7308. P. 812–814.
- Gilles C., Motais R. Effect of catecholamines on deformability of red cells from trout: relative roles of cyclic AMP and cell volume // J. Physiol. 1989. Vol. 412, no. 1. P. 321–332.
- Girish V., Vijayalakshmi A. Affordable image analysis using NIH Image/Image J // Indian J. Cancer. 2004. Vol. 41, no. 1. P. 41–47.
- Hochachka P.W., Somero G.N. Biochemical adaptation: Mechanism and process in physiological evolution. Oxford: Oxford Univ. Press. 2002. 480 p.
- Houchin D.N., Munn J.I., Parnell B.L. A method for the measurement of red cell dimensions and calculation of mean corpuscular volume and surface area // Blood. 1958. Vol. 13. P. 1185–1191.
- Jensen F.B. Regulatory volume decrease in carp red blood cells: mechanisms and oxygenation-dependency of volume-activated potassium and amino acid transport // J. Exp. Biol. 1995. Vol. 198. P. 155–165.
- Jensen F.B. Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O_2 and CO_2 transport // Acta Physiol. Scand. 2004. Vol. 182, no. 3. P. 215–227.
- Levin L.A. Oxygen minimum zone influence on the community structure of deep-sea benthos // Fish physiology, toxicology, and water quality: Proc. 6th Int. Symp. La Paz, B.C.S., Mexico. 2002. P. 121.
- Middelburg J.J., Levin L.A. Coastal hypoxia and sediment biogeochemistry // Biogeosci. Discuss. 2009. Vol. 6, no. 2. P. 3655–3706.
- Mommsen T.P., French C.J., Hochachka P.W. Sites and patterns of protein and amino acid utilization during the spawning migration of salmon // Can. J. Zool. 1980. Vol. 58, no. 10. P. 1785–1799.
- Motais R., Borge F., Fievet B. Regulation of Na^+/H^+ exchange and pH in erythrocytes of fish // Comp. Biochem. Physiol. A. 1992. Vol. 102, no. 4. P. 597–602.
- Nikinmaa M. Control of red cell pH in teleost fishes // Ann. Zool. Fenn. 1986. Vol. 23, no. 2. P. 223–235.
- Nikinmaa M. Adrenergic control of oxygen transport in salmonids // Fisch.-Forsch. 1991. Vol. 29, no. 3. P. 64–65.
- Perry S.F., Fritzsche R., Hoagland T.M. et al. The control of blood pressure during external hypercapnia in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // J. Exp. Biol. 1999. Vol. 202, no. 16. P. 2177–2190.
- Perry S.F., Wood Ch.M. Control and coordination of gas transfer in fishes // Can. J. Zool. 1989. Vol. 67, no. 12. P. 2961–2970.
- Reid S.G., Perry S.F. Cholinergic-mediated control of catecholamine release from chromaffin cells in the American eel, *Anguilla rostrata* // J. Comp. Physiol. B. 1995. Vol. 165, no. 6. P. 464–470.
- Soldatov A.A. Red blood system in fish: peculiarities of its organization and function // Zh. Evol. Biokhim. Fiziol. 2005. Vol. 41, no. 3. P. 217–223.
- Soldatov A.A., Andreenko T.I., Golovina I.V., Stolbov A.Y. Peculiarities of organization of tissue metabolism in molluscs with different tolerance to external hypoxia // J. Evol. Biochem. Physiol. 2010. Vol. 46, no. 4. P. 341–349.

- Soldatov A.A., Andreeva A. Yu., Novitskaya V.N., Parfenova I.A.* Coupling of membrane and metabolic functions in nucleated erythrocytes of *Scorpaena porcus* L. under hypoxia *in vivo* and *in vitro* // J. Evol. Biochem. Physiol. 2014. Vol. 50, no. 5. P. 409–415.
- Soldatov A.A., Parfyonova I.A., Konoshenko S.V.* Haemoglobin system of Black Sea round goby under experimental hypoxia conditions // Ukr. Biokh. Zh. 2004. Vol. 76, no. 3. P. 85–90.
- Stoeck T., Taylor G.T., Epstein S.S.* Novel eukaryotes from the permanently anoxic Cariaco Basin (Caribbean Sea) // Appl. Environ. Microbiol. 2003. Vol. 69, no. 9. P. 5656–5663.
- Tufts B.* *In vitro* evidence for sodium-dependent pH regulation in sea lamprey (*Petromyzon marinus*) red blood cells // Can. J. Zool. 1992. Vol. 70, no. 3. P. 411–416.
- Val A.L., De Menezes G.C., Wood C.M.* Red blood cell adrenergic responses in Amazonian teleosts // J. Fish Biol. 1997. Vol. 52, no. 1. P. 83–93.
- Van Waarde A.* Biochemistry of non-protein nitrogenous compounds in fish including the use of amino acids for anaerobic energy production // Comp. Biochem. Physiol. B. 1988. Vol. 91, no. 2. P. 207–228.
- Wells R.M.G.* Blood gas transport and hemoglobin function: adaptations for functional and environmental hypoxia // Fish Physiol. 2009. Vol. 27. P. 255–299.
- Wood C.M., Simmons H.* The conversion of plasma HCO_3^- to CO_2 by rainbow trout red blood cells *in vitro*: adrenergic inhibition and the influence of oxygenation status // Fish Physiol. Biochem. 1994. Vol. 12, no. 6. P. 445–454.

КЛЮЧ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЗОЭА РОЮЩИХ КРЕВЕТОК ИНФРАОТРЯДОВ GEBIIDEA И AXIIDEA ИЗ ЗАЛИВА ПЕТРА ВЕЛИКОГО ЯПОНСКОГО МОРЯ*

© 2017 О. М. Корн, Д. Д. Голубинская, Е. С. Корниенко

Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского, Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН, Владивосток 690041

e-mail: okorn@mail.primorye.ru

Статья принята к печати 01.12.2016 г.

Разработан иллюстрированный ключ для определения стадии зоэа I роющих креветок инфраотрядов Gebiidea и Axiidea в планктоне зал. Петра Великого Японского моря. Обобщены основные морфологические характеристики личинок этих групп. Обсуждается возможность варьирования количества стадий зоэа креветок инфраотрядов Gebiidea и Axiidea в разных популяциях и/или при различных условиях культивирования.

Ключевые слова: зоэа, личинки, планктон, креветки, Gebiidea, Axiidea, зал. Петра Великого, Японское море.

A key for the identification of zoeae of burrowing shrimps of the infraorders Gebiidea and Axiidea in Peter the Great Bay, the Sea of Japan. O. M. Korn, D. D. Golubinskaya, E. S. Kornienko (A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology, National Scientific Centre of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041)

An illustrated key for the identification of the first zoeal stage of burrowing shrimps of the infraorders Gebiidea and Axiidea in the plankton of Peter the Great Bay (the Sea of Japan) has been elaborated. Summary of the main morphological features of gebiidean and axiidean larvae is presented. The possibility of variation of the number of zoeal stages of the infraorders Gebiidea and Axiidea in different populations and/or under different laboratory conditions is discussed. (Biologiya Morya, 2017, vol. 43, no. 5, pp. 341–348).

Keywords: zoea, larva, plankton, shrimp, Gebiidea, Axiidea, Peter the Great Bay, Sea of Japan.

Зоэа роющих креветок инфраотрядов Gebiidea и Axiidea представляют собой обычный компонент мезопланктона. Это крупные личинки, карапакс которых уплощен латерально, эндоподит антенны несегментированный, второй вырост тельсона в виде тонкой "талассинидной" щетинки. На заднем крае тельсона находится медиальный шип или медиальная выемка, на месте которой на стадии зоэа II появляется медиальный шип.

Исследования последних лет показали, что в зал. Петра Великого Японского моря встречаются личинки восьми видов роющих креветок. Развитие каждого из этих видов прослежено в лабораторных условиях. Личинки *Upogebia issaeffi* (Balss, 1913), *U. yokoyai* Makarov, 1938, *Boasaxius princeps* (Boas, 1880), *Leonardsaxius amurensis* (Kobjakova, 1973) и *Nihonotrypaea makarovi* Marin, 2013 описаны впервые (Kornienko et al., 2012, 2013, 2014, 2017; Korn et al., 2016). В работах приведены ключи для определения разных стадий зоэа данных видов. В лабораторных условиях получены также личинки *Upogebia major* (De Haan, 1841), *Nihonotrypaea petalura* (Stimpson, 1860) и *N. japonica* (Ortmann, 1891), изученные ранее в прибрежных водах Японии (Konishi, 1989; Konishi et al., 1990; Miyabe et al., 1998), что позволило сравнить особенности развития этих видов в разных частях ареала.

Изучение сезонной динамики, плотности и распре-

деления личинок Gebiidea и Axiidea в Амурском и Уссурийском заливах показало, что они встречаются в планктоне с мая по октябрь при температуре воды 12–23°C. Средняя плотность личинок составляет не более 4 экз/м³, их доля от общей численности личинок десятиногих ракообразных достигает 18%. В целом в Амурском заливе доминируют личинки семейства Upogebiidae, в Уссурийском заливе – семейства Callianassidae. Наиболее многочисленны зоэа *U. major* (до 37 экз/м³) и *N. makarovi* (до 46 экз/м³). Зоэа семейства Axiidae встречаются единично (Голубинская и др., 2016).

Первая личиночная стадия любого вида Decapoda – самая массовая в планктоне, поэтому в настоящей работе представлен ключ для определения стадии зоэа I роющих креветок, обитающих в российских водах Японского моря. Дополнительно приведены общие характеристики личинок первых трех стадий зоэа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа выполнена в июне–августе 2011–2015 гг. на Морской биологической станции "Восток" Национального научного центра морской биологии (ННЦМБ) ДВО РАН (зал. Восток, Японское море).

Личинки *Upogebia major*, *U. issaeffi*, *U. yokoyai*, *Nihonotrypaea petalura*, *N. japonica* и *Boasaxius princeps* были получены от самок соответствующих видов и выращены в лабо-

*Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта № 15-I-6-059 Программы ДВО РАН «Дальний Восток» и Российского фонда фундаментальных исследований грант № 16-34-00059.

ратории до стадии мегалопы (Kornienko et al., 2012, 2013, 2014, 2015). Для вида *Nihonotrypaea makarovi* описана только первая стадия зоза (Korn et al., 2016). Яйценосные самки *Leonadsaxius amurensis* не были найдены, поэтому личинок первой стадии, предположительно принадлежащих *L. amurensis*, отбирали из планктона и культивировали до стадии мегалопы. Их видовая принадлежность подтверждена с помощью сравнительного молекулярно-генетического анализа личинок и взрослых особей (Kornienko et al., 2017).

Личинок фиксировали в 4% растворе формальдегида. Для описания и промеров использовали не менее 10 личинок каждой стадии. Измеряли общую длину личинки от кончика рострального шипа до заднего края тельсона (TL) и длину карапакса от кончика рострального шипа до заднего края карапакса (CL). Для определения меры разброса размеров рассчитывали стандартное отклонение. Контуры личинок зарисовывали под микроскопами Ergaval и Olympus CX41 с помощью рисовального аппарата.

Образцы личинок хранятся в Музее ННЦМБ ДВО РАН

(каталожные номера: *U. yokoyai* – 27589, *U. issaefi* – 26559, *B. princeps* – 28312, *N. petalura* – 29215 и 29216, *N. makarovi* – 31897, *L. amurensis* – 31964).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ключ для определения зоза I роющих креветок Gebiidea и Axiidea из зал. Петра Великого Японского моря

- 1а. На плеональных сомитах имеются непарные постеродорсальные шипы; фронтальный край карапакса с парой антеннальных шипов; рострум широкий, уплощенный, покрыт мелкими шипиками, его длина заметно больше 1/2 длины карапакса (рис. 1). Инфраотряд Axiidea.....2
- 1б. На плеональных сомитах непарные постеродорсальные шипы отсутствуют; антеннальные шипы на карапаксе отсутствуют; рострум узкий, заостренный,

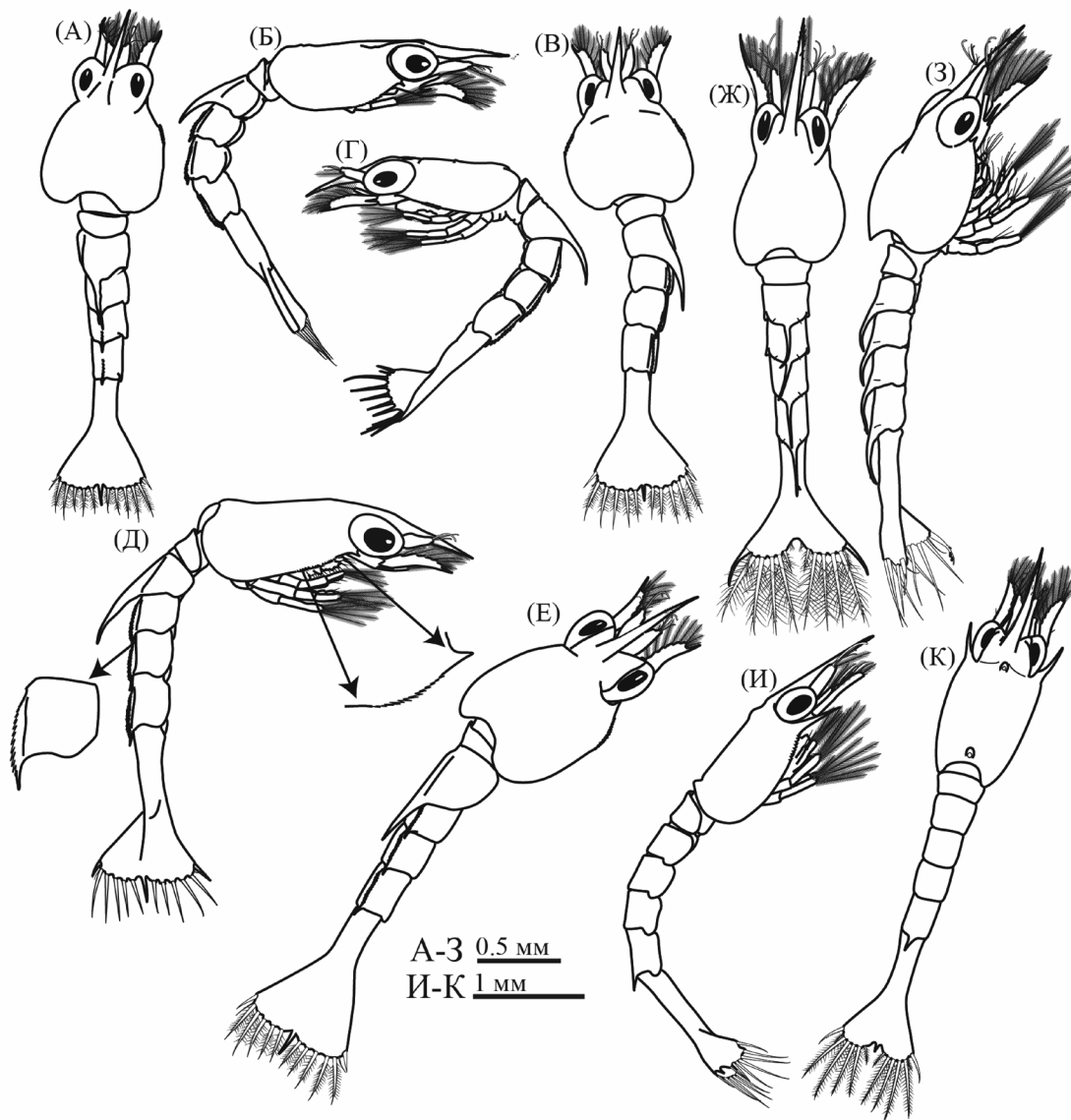


Рис. 1. Внешний вид зоза I инфраотряда Axiidea. А, Б – *Nihonotrypaea japonica*; В, Г – *N. petalura*; Д, Е – *N. makarovi*; Ж, З – *Boasaxius princeps*; И, К – *Leonadsaxius amurensis*.

- невооруженный, его длина около 1/4 длины карапакса (рис. 2). Инфраотряд Gebiidea 6
- 2а. Плеональные сомиты 2–5 каждый с непарным постеродорсальным шипом; на заднем крае тельсона находится медиальная выемка, медиальный шип отсутствует (рис. 3А) *Boasaxius princeps*
- 2б. Только один из плеональных сомитов с непарным постеродорсальным шипом, на заднем крае тельсона присутствует медиальный шип 3
- 3а. Плеональный сомит 2 с длинным непарным постеродорсальным шипом; на сомитах 3–5 имеются зубчатые гребни (рис. 3Б) 4
- 3б. Плеональный сомит 5 с коротким непарным постеродорсальным шипом, зубчатые гребни на сомитах 3–5 отсутствуют (рис. 3В) *Leonardsaxius amurensis*
- 4а. На экзоподите антенны две терминальные перистые щетинки (рис. 4А) *Nihonotrypaea makarovi*
- 4б. На экзоподите антенны одна терминальная перистая щетинка (рис. 4Б) 5
- 5а. На коксе максиллипеда II одна перистозубчатая щетинка (рис. 4В) *N. japonica*
- 5б. На коксе максиллипеда II щетинок нет (рис. 4Г) *N. petalura*
- 6а. На плеональных сомитах 4 и 5 по два коротких постеродорсальных и постеролатеральных шипа (рис. 5А) ... *Upogebia yokoyai*
- 6б. На плеональных сомитах шипов нет (рис. 5Б) 7

- 7а. Густоперистые щетинки присутствуют на втором, третьем и пятом члениках эндоподита максиллипеда I (рис. 5В) *U. issaeffi*
- 7б. Густоперистая щетинка присутствует только на пятом членике эндоподита максиллипеда I (рис. 5Г) *U. major*.

Продолжительность личиночного развития у исследуемых видов заметно различалась в зависимости от количества стадий зоа. Наиболее короткий цикл развития отмечен у личинок рода *Upogebia*: у *U. major* – три стадии зоа, у *U. issaeffi* и *U. yokoyai* – четыре. Более длительное развитие наблюдалось у *Axiidea*: пять стадий зоа у *L. amurensis* и *N. japonica*, семь – у *N. petalura*, восемь – у *B. princeps*. В лабораторных условиях развитие *N. makarovi* до стадии зоа IV проходило достаточно синхронно, однако в дальнейшем линьки становились беспорядочными, поэтому их точное количество определить не удалось. Следовательно, цикл развития *N. makarovi* включает не менее пяти стадий зоа.

Согласно нашим данным, у зоа исследованных видов расположение шипов на сомитах плеона в ходе развития не изменяется. Это позволяет без препарирования на любой стадии идентифицировать до вида зоа *B. princeps*, *L. amurensis* и *U. yokoyai* и до рода зоа *Nihonotrypaea*. Различие в строении максиллипеда I позволяет довольно легко определить личинок *U. major* и *U. issaeffi* на стадии зоа I (рис. 5В, Г). На старших ста-

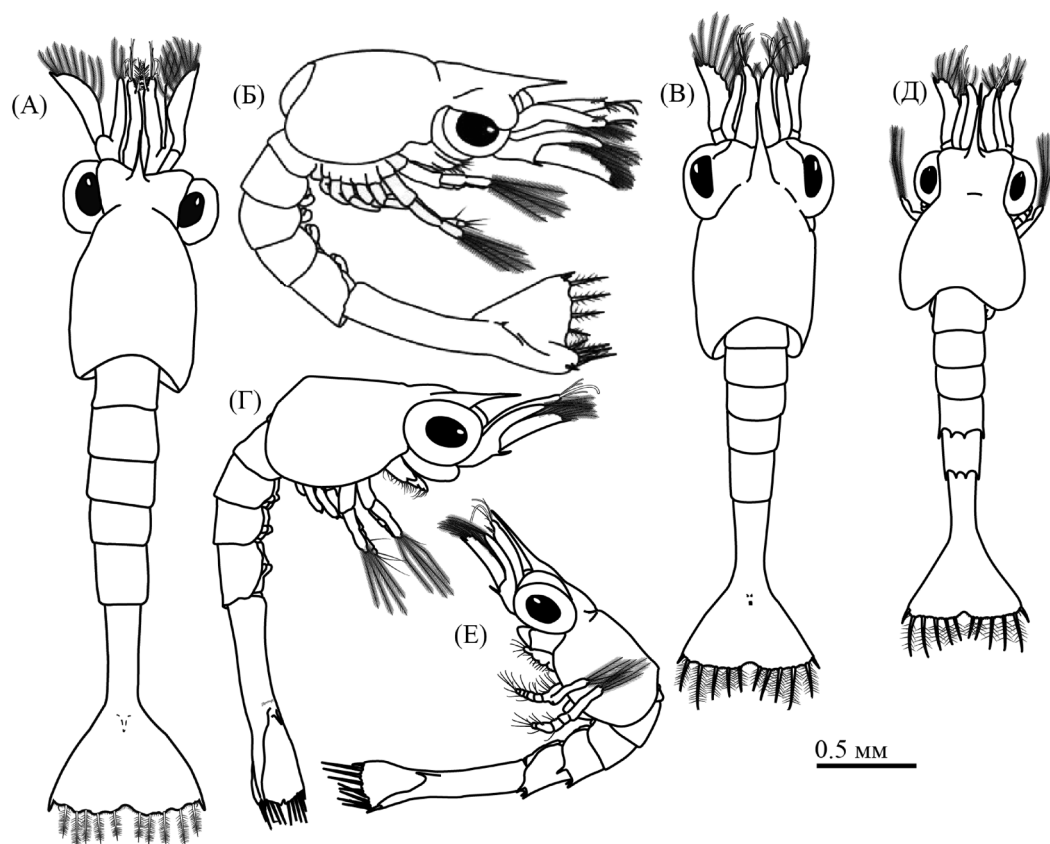


Рис. 2. Внешний вид зоа I инфраотряда Gebiidea. А, Б – *Upogebia major*; В, Г – *U. issaeffi*; Д, Е – *U. yokoyai*.

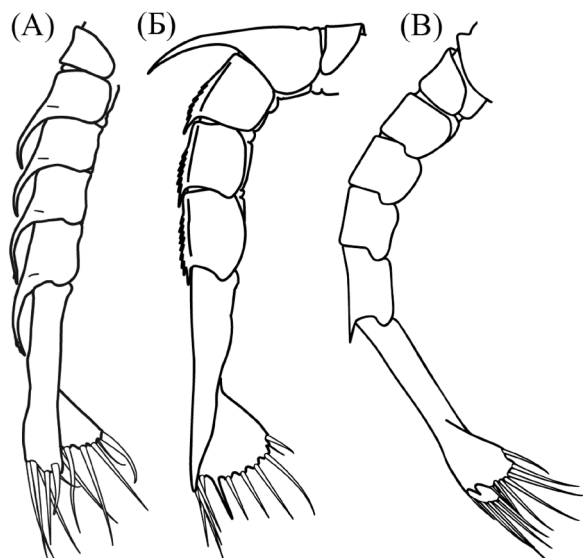


Рис. 3. Плеон и тельсон зоза I. А – *Boasaxius princeps*; Б – *Nihonotrypaea japonica*, *N. petalura*, *N. makarovi*; В – *Leonardsaxius amurensis*.

дях морфологические различия зоза этих видов столь незначительны, что их сложно использовать для идентификации. В нефиксированных пробах зоза *N. makarovi* на всех стадиях хорошо отличаются от личинок двух других видов рода присутствием пары крупных оранжевых хроматофоров у вентральных краев карапакса. Видовую принадлежность фиксированных личинок рода *Nihonotrypaea* на стадиях зоза II и III можно определить по числу щетинок на коксе максиллипеда II (*N. petalura* – 0, *N. japonica* – 1, *N. makarovi* – 2 щетинки), к тому же зоза *N. makarovi* заметно крупнее, чем личинки других видов *Nihonotrypaea* (табл. 1). На старших стадиях определить их до вида невозможно.

В разных группах декапод существуют универсальные сочетания признаков, по которым можно определить стадию зоза. Большое разнообразие количества стадий развития у роющих креветок позволило нам выделить эти признаки только для первых трех стадий зоза. В качестве дополнительного признака при определении стадии могут быть использованы размеры личинок (табл. 1). На стадии зоза I глаза сидячие; на экзоподитах максиллипедов I и II по 4 плавательные щетинки; двуветвистый максиллипед III у *Upogebia* невооруженный, у остальных видов с 5–6 плавательными щетинками на экзоподите; плеон состоит из пяти сомитов, уropоды и плеоподы отсутствуют (исключение – зоза *U. issaeffi* и *U. major*, у которых почки плеоподов заметны уже на первой стадии). На стадии зоза II глаза стебельчатые; на экзоподитах максиллипедов I и II по 6 плавательных щетинок; плеон состоит из пяти сомитов, уropоды и плеоподы обычно отсутствуют (у личинок *U. yokoyai* почки плеоподов появляются на этой стадии); есть медиальный шип на заднем крае тельсона. У зоза *Upogebia* появляются плавательные щетинки на экзоподитах максиллипеда III и переоподов 1–3. У *Nihonotrypaea* и *B. princeps* на этой стадии только две первые пары невооруженных переоподов. У зоза *L. amurensis* хорошо развиты все пять пар переоподов, хотя плавательные щетинки на экзоподитах отсутствуют. Почка пальпы на мандибуле отсутствует у личинок всех видов, за исключением *L. amurensis*. На стадии зоза III у всех видов отделяется шестой плеональный сомит; на мандибуле появляется почка пальпы; имеются уropоды, тельсон становится трапециевидным (исключение – вид *B. princeps*, у личинок которого отсутствуют плеоподы и почка пальпы на мандибуле). Для *U. major* это последняя стадия зоза.

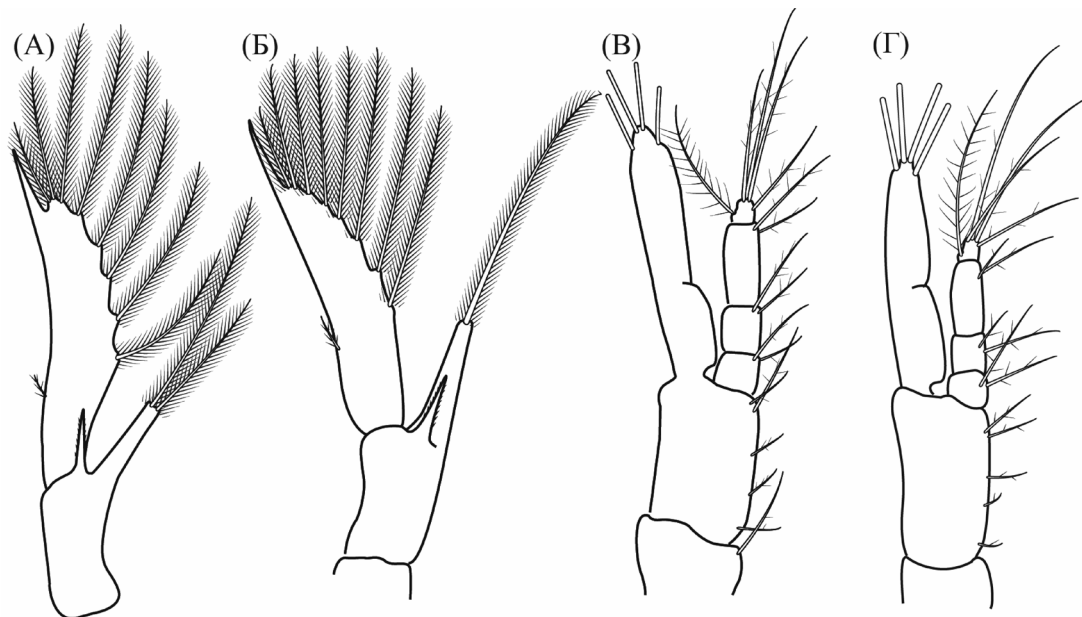


Рис. 4. Антенна (А – *Nihonotrypaea makarovi*; Б – *N. japonica*, *N. petalura*) и максиллипед II (Б – *N. japonica*; Г – *N. petalura*) зоза I.

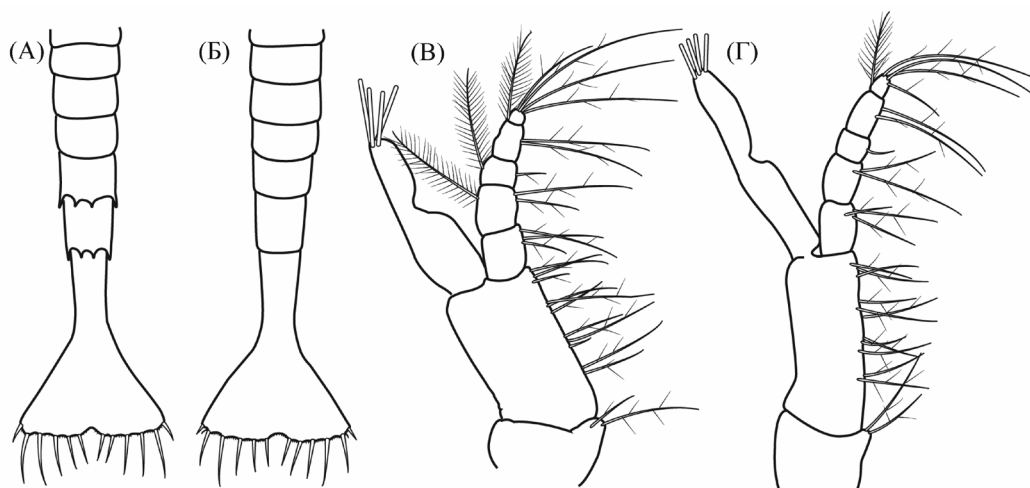


Рис. 5. Плеон, тельсон (А – *Upogebia yokoyai*; Б – *U. major*, *U. issaeffi*) и максиллипед I (В – *Upogebia major*; Г – *U. issaeffi*) зоза I.

Таблица 1. Размеры (среднее $\pm$ SD, мм) выращенных в лаборатории личинок роющих креветок

Вид	Зоза I		Зоза II		Зоза III		Зоза IV		Зоза V		Зоза VI		Зоза VII		Зоза VIII	
	TL	CL	TL	CL	TL	CL	TL	CL	TL	CL	TL	CL	TL	CL	TL	CL
<i>Upogebia major</i>	3.36 $\pm$ 0.2	1.15 $\pm$ 0.07	4.00 $\pm$ 0.13	1.30 $\pm$ 0.06	4.06 $\pm$ 0.25	1.42 $\pm$ 0.09	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>U. yokoyai</i>	2.79 $\pm$ 0.15	0.87 $\pm$ 0.06	3.08 $\pm$ 0.07	1.02 $\pm$ 0.07	3.28 $\pm$ 0.09	1.08 $\pm$ 0.04	3.48 $\pm$ 0.06	1.19 $\pm$ 0.04	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>U. issaeffi</i>	2.83 $\pm$ 0.11	1.00 $\pm$ 0.06	3.04 $\pm$ 0.14	1.01 $\pm$ 0.09	3.47 $\pm$ 0.23	1.25 $\pm$ 0.09	4.16 $\pm$ 0.38	1.37 $\pm$ 0.11	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Nihonotrypaea japonica</i>	3.16 $\pm$ 0.08	1.26 $\pm$ 0.08	3.66 $\pm$ 0.13	1.56 $\pm$ 0.04	4.21 $\pm$ 0.05	1.85 $\pm$ 0.68	5.01 $\pm$ 0.12	2.11 $\pm$ 0.05	5.64 $\pm$ 0.08	2.43 $\pm$ 0.05	–	–	–	–	–	–
<i>N. petalura</i>	2.90 $\pm$ 0.07	1.24 $\pm$ 0.06	3.50 $\pm$ 0.11	1.53 $\pm$ 0.08	4.10 $\pm$ 0.25	1.89 $\pm$ 0.08	4.30 $\pm$ 0.06	2.16 $\pm$ 0.06	5.40 $\pm$ 0.16	2.36 $\pm$ 0.03	6.30 $\pm$ 0.17	2.69 $\pm$ 0.05	6.70 $\pm$ 0.05	2.97 $\pm$ 0.05	–	–
<i>N. makarovi</i>	3.66 $\pm$ 0.04	1.51 $\pm$ 0.02	4.28 $\pm$ 0.04	1.74 $\pm$ 0.02	5.16 $\pm$ 0.03	2.29 $\pm$ 0.02	5.53 $\pm$ 0.14	2.38 $\pm$ 0.03	*	*	*	*	*	*	–	–
<i>Boasaxius princeps</i>	3.45 $\pm$ 0.10	1.52 $\pm$ 0.03	4.09 $\pm$ 0.03	1.70 $\pm$ 0.04	4.60 $\pm$ 0.11	1.85 $\pm$ 0.05	5.96 $\pm$ 0.18	2.56 $\pm$ 0.11	6.98 $\pm$ 0.12	3.00 $\pm$ 0.08	8.44 $\pm$ 0.27	3.62 $\pm$ 0.18	9.17 $\pm$ 0.39	3.98 $\pm$ 0.22	10.8 $\pm$ 0.33	4.62 $\pm$ 0.13
<i>Leonardsaxius amurensis</i>	5.27 $\pm$ 0.15	2.32 $\pm$ 0.05	5.54 $\pm$ 0.21	2.31 $\pm$ 0.11	5.76 $\pm$ 0.33	2.51 $\pm$ 0.09	5.15 $\pm$ 0.41	2.66 $\pm$ 0.17	6.65 $\pm$ 0.29	2.91 $\pm$ 0.17	–	–	–	–	–	–

*Размеры неизвестны.

Примечание. TL – общая длина личинки; CL – длина карапакса; "–" – стадия отсутствует.

ОБСУЖДЕНИЕ

Основные морфологические характеристики зоза инфраотрядов Gebiidea и Axiidea

В середине прошлого века Гурни (Gurney, 1938, 1942) выделил два типа зоза роющих креветок и на основании их морфологии разделил надсемейство Thalassinidea на две группы: аномурную (Upogebiidae + Laomediidae) и омарную (Axiidae + Callianassidae). Позже в соответствии с морфологией взрослых особей талассиниды были разделены на две группы: Gebiidea и Axiidea (см.: de Saint Laurent, 1979). Новые филогенетические исследования с использованием молекулярных данных показали, что талассиниды – это парафилетическая группа, которая разделяется на два инфраотряда – Gebiidea и Axiidea (см.: Bracken et al., 2009; Robles et al., 2009), что полностью

согласуется с первоначальной гипотезой Гурни (Gurney, 1938, 1942), основанной на морфологии личинок.

Учитывая большое количество новых сведений, появившихся после 1938 г., Пол и Сантана (Pohle, Santana, 2014) уточнили основные морфологические характеристики личинок двух типов. У зоза Gebiidea отсутствуют антеролатеральные зубчики на карапаксе. Роострум невооруженный, относительно короткий (менее 1/4 длины карапакса). На плеоне нет крупных одиночных дорсальных шипов. У упогебий иногда имеются мелкие парные шипы на сомитах 4 и 5. Медиальный шип на заднем крае тельсона отсутствует или короткий, но всегда отсутствует на стадии зоза I. Эндоподит максиллипеда III часто рудиментарный. Переопод 5 одноветвистый. У личинок Axiidea, напротив, часто имеются антеролатеральные

зубчики на карапаксе. Рострум обычно уплощенный, зазубренный и относительно длинный (больше или равен 1/2 длины карапакса). Имеется хотя бы один дорсальный плеональный шип. Почти все личинки с медиальным шипом на заднем крае тельсона, который длиннее, чем у Gebiidea. Эндоподит максиллипеда III часто сегментирован и вооружен щетинками. Переопод 5 у некоторых видов двуветвистый (Pohle, Santana, 2014).

Основные морфологические характеристики зоа рода *Upogebia* из зал. Петра Великого совпадают с приведенными выше признаками личинок Gebiidea. Для видов семейств Axiidae и Callianassidae в первую очередь необходимо отметить наличие антеннальных шипов, поскольку антеролатеральные зубчики на стадии зоа I присутствуют только у личинок рода *Nihonotrypaea*, а у *Leonardsaxius amurensis* и *Boasaxius princeps* они появляются на стадии зоа II. На стадии зоа I у всех исследованных нами видов аксий и каллианассид рострум в дистальной части покрыт мелкими шипиками, на последующих стадиях его латеральные края становятся зазубренными. Длинный медиальный шип на заднем крае тельсона на стадии зоа I есть у *Nihonotrypaea* и *L. amurensis*, а у *B. princeps* он появляется на стадии зоа II. Выполненное нами первоописание личинок пяти видов роющих креветок подтвердило справедливость разделения личинок этой группы на два морфотипа, а талассинид на два инфраотряда – Gebiidea и Axiidea.

Число стадий зоа у роющих креветок

Число личиночных стадий у разных видов инфраотрядов Gebiidea и Axiidea значительно различается – от прямого развития у *Upogebia savignyi* (Gurney, 1937) до восьми стадий зоа у *B. princeps* (см.: Kornienko et al., 2014). У видов рода *Upogebia* количество стадий зоа варьирует от двух до пяти, наиболее распространенный паттерн развития три–четыре стадии зоа. В семействе Callianassidae развитие включает от двух до семи стадий зоа, причем наиболее распространенный вариант – пять стадий. Постэмбриональное развитие семейства Axiidae

слабо изучено, однако известно, что оно может включать от двух до восьми стадий зоа.

Количество личиночных стадий – одна из важных характеристик вида. Однако у личинок *Nihonotrypaea petalura*, обитающей в российских водах, насчитывают семь стадий зоа (Kornienko et al., 2015), в то время как ранее для этого вида из зал. Ариаке (о-в Кюсю) были описаны шесть стадий зоа (Konishi et al., 1990). Позже авторы заключили, что пять стадий – это стандартное количество стадий зоа у каллианассид, а зоа IV и V у *N. petalura* почти не различаются (Miyabe et al., 1998; Konishi et al., 1999). Условия выращивания *N. petalura* в японской и российской лабораториях несколько различались. В обоих случаях отмечена высокая смертность зоа *N. petalura* на ранних стадиях, которая, по-видимому, была обусловлена значительной адгезией личинок к поверхностной пленке воды (Konishi et al., 1990; Kornienko et al., 2015). Шесть стадий зоа *N. petalura* из разных популяций были сходны по размерам (табл. 2) и морфологии. Полученные нами зоа VII этого вида были более крупными и развитыми, чем зоа предыдущей стадии. В строении личинок прослеживались черты, характерные для стадии, предшествующей линьке на стадию мегалопы (эндоподиты антенны и антеннулы длиннее экзоподитов, хорошо развиты клешненосные переоподы, длина плеоподов больше длины сомита), которые были отмечены у последних стадий зоа *Neotrypaea uncinata*, *Nihonotrypaea japonica*, *N. harmandi* и других каллианассид (Aste, Retamal, 1984; Miyabe et al., 1998; Konishi et al., 1999).

В отличие от личинок *N. petalura*, зоа *N. japonica* были очень неприхотливы, в лабораторных условиях их смертность была близка к нулю; перед линькой на стадию мегалопы все они проходили через пять стадий зоа. Несмотря на то, что условия выращивания *N. japonica* в разных лабораториях также несколько различались, количество стадий зоа у этого вида было стабильным. Зоа *N. japonica* из разных популяций были сходны по размерам (табл. 2), морфология личинок практически

Таблица 2. Длина карапакса (мм) выращенных в лаборатории личинок роющих креветок из разных популяций

Стадия	<i>Upogebia major</i>		<i>Nihonotrypaea japonica</i>		<i>Nihonotrypaea petalura</i>	
	зал. Петра Великого (наши данные; среднее±SD)	зал. Аккеси (Konishi, 1989; диапазон)	зал. Петра Великого (наши данные; среднее±SD)	зал. Ариаке (Miyabe et al., 1998; среднее±SD)	зал. Петра Великого (наши данные; среднее±SD)	зал. Ариаке (Konishi et al., 1990; среднее)
Зоа I	1.15±0.07	1.08–1.10	1.3±0.07	1.09±0.05	1.24±0.06	1.24
Зоа II	1.3±0.06	1.09–1.20	1.5±0.04	1.41±0.12	1.53±0.08	1.38
Зоа III	1.42±0.09	1.27–1.32	2.07±0.12	1.74±0.04	1.89±0.08	1.76
Зоа IV	–	–	2.1±0.05	1.90±0.12	2.16±0.06	2.20
Зоа V	–	–	2.4±0.05	2.03±0.11	2.36±0.03	2.41
Зоа VI	–	–	–	–	2.69±0.05	–
Зоа VII	–	–	–	–	2.97±0.05	–

Примечание. "–" – стадия отсутствует.

не различалась. Возможно, что *N. japonica*, обитающая в заиленном песке, является более эврибионтным видом, чем *N. petalura*, населяющая каменистый и смешанный грунты и предпочитающая более чистую воду, поэтому степень выживаемости личинок *N. japonica* была выше.

Результаты, полученные при изучении развития *N. petalura*, не являются единственным примером. Начиная с 1919 г. (Webb, 1919), в литературе появляются многочисленные сведения о варьировании количества стадий зоза у одного и того же вида роющих креветок, что особенно характерно для каллианассид (см.: Pohle, Santana, 2014; Kornienko et al., 2015). Количество стадий может варьировать в разных популяциях одного и того же вида и/или при разных условиях культивирования. Дополнительная личиночная стадия может быть результатом субоптимальных условий культивирования и не встречаться в естественных условиях.

У видов рода *Upogebia* случаи варьирования количества личиночных стадий редки (Paula et al., 2001; dos Santos, Paula, 2003). В наших экспериментах все три вида *Upogebia* независимо от условий культивирования имели стабильное количество стадий зоза. Сравнение личиночного развития *U. major* в зал. Петра Великого и у побережья о-ва Хоккайдо (Konishi, 1989) показало, что количество стадий у этого вида не зависело от местообитания, хотя зоза *U. major* из российских вод были немного крупнее (табл. 2) и на конечностях у них было больше щетинок. Подобные различия обычны для личинок из разных популяций.

Наличие большого количества личиночных стадий характерно для низших ракообразных и, по-видимому, служит примитивным признаком. Для таких представителей низших раков, как жаброногие, ветвистоусые раки, копеподы и др., характерно длительное личиночное развитие. Лишь после 10 линек и более они достигают взрослого состояния (Догель, 2015). В ходе эволюции количество личиночных стадий у ракообразных сокращается, и высшие раки – изоподы, амфиоподы, кумовые раки, мизиды – имеют прямое развитие (Иванова-Казас, 1979). Среди роющих креветок длительное развитие характерно для Axiidea. Большее количество стадий зоза и возможность варьирования этого признака у одного и того же вида при разных условиях обитания или культивирования подтверждают примитивность Axiidea по сравнению с Gebiidea. Кониси (Konishi, 1989) полагал, что по строению личинок семейство Upogebiidae (Gebiidea) занимает промежуточное положение между более примитивным семейством Axiidae (Axiidea) и более продвинутом семейством Laomediidae (Gebiidea). Это подтверждено данными молекулярно-генетического анализа: в филогенетической системе роющих креветок Axiidea занимают базальное положение (Tsang et al., 2008).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Голубинская Д.Д., Корн О.М., Корниенко Е.С. Сезонная динамика плотности и распределение личинок роющих креветок

инфраотрядов Gebiidea и Axiidea в Амурском и Уссурийском заливах Японского моря // Биол. моря. 2016. Т. 42, № 3. С. 204–214.

Догель В.А. Зоология беспозвоночных. М.: ЛЕНАНД. 2015. Вып. 8. 628 с.

Иванова-Казас О.М. Сравнительная эмбриология беспозвоночных животных. Членистоногие. М.: Наука. 1979. 224 с.

Aste A., Retamal M.A. Desarrollo larval de *Callinassa uncinata* H. Milne Edwards, 1837 (Decapoda, Callinassidae) bajo condiciones de laboratorio // Gayana. Zool. 1984. Vol. 48, nos. 1–2. P. 41–56.

Bracken H.D., Toon A., Felder D.L. et al. The decapod tree of life: compiling the data and moving toward a consensus of decapod evolution // Arthropod Syst. Phylog. 2009. Vol. 67, no. 1. P. 99–116.

de Saint Laurent M. Vers une nouvelle classification des Crustacés Decapodés Reptantia // Bull. Off. Natl. Pêches Répub. Tunis. Minist. Agric. 1979. Vol. 3. P. 15–31.

dos Santos A., Paula J. Redescription of the larval stages of *Upogebia pusilla* (Petagna, 1792) (Thalassinidea, Upogebiidae) from laboratory-reared material // Invertebr. Reprod. Dev. 2003. Vol. 43, no. 1. P. 83–90.

Gurney R. Notes on some decapod Crustacea from the Red Sea. II. The larvae of *Upogebia savignyi* (Strahl) // Proc. Zool. Soc. London. 1937. Vol. 107. P. 85–101.

Gurney R. Larvae of decapod Crustacea. Part V. Nephropsidae and Thalassinidea // Discovery Rep. 1938. Vol. 17. P. 293–344.

Gurney R. Larvae of decapod Crustacea. London: Ray Society. 1942. 306 p.

Konishi K. Larval development of the mud shrimp *Upogebia* (*Upogebia*) *major* (De Haan) (Crustacea: Thalassinidea: Upogebiidae) under laboratory conditions, with comments on larval characters of thalassinid families // Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult. (Japan). 1989. Vol. 15. P. 1–17.

Konishi K., Fukuda Y., Quintana R. The larval development of the mud burrowing shrimp *Callinassa* sp. under laboratory conditions (Decapoda, Thalassinidea, Callinassidae) // Crustaceans and the biodiversity crisis. Leiden: Brill. 1999. P. 781–804.

Konishi K., Quintana R., Fukuda Y. A complete description of the larval stages of the ghost shrimp *Callinassa petalura* Stimpson (Crustacea: Thalassinidea: Callinassidae) under laboratory conditions // Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult. (Japan). 1990. Vol. 17. P. 27–49.

Korn O.M., Kornienko E.S., Golubinskaya D.D. First stage larva of the mud shrimp *Nihonotrypaea makarovi* Marin, 2013 (Decapoda: Axiidea: Callinassidae) obtained in the laboratory // Zootaxa. 2016. Vol. 4083, no. 3. P. 251–256.

Kornienko E.S., Golubinskaya D.D., Korn O.M., Sharina S.N. The complete description of larval stages of the lobster shrimp *Leonardsaxius amurens* (Kobjakova, 1937) (Decapoda: Axiidea: Axiidae) identified by DNA barcoding // J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 2017. doi: 10.1017/S0025315417000510

Kornienko E.S., Korn O.M., Demchuk D.D. The larval development of the mud shrimp *Upogebia issaeffi* (Balss, 1913) (Decapoda: Gebiidea: Upogebiidae) reared under laboratory conditions // Zootaxa. 2012. Vol. 3269. P. 31–46.

Kornienko E.S., Korn O.M., Demchuk D.D. The larval development of the mud shrimp *Upogebia yokoyai* Makarov, 1938 (Decapoda: Gebiidea: Upogebiidae) reared under laboratory conditions // J. Nat. Hist. 2013. Vol. 47, nos. 29–30. P. 1933–1952.

Kornienko E.S., Korn O.M., Golubinskaya D.D. The complete larval development of the lobster shrimp *Boasaxius princeps* Boas,

- 1880 (Decapoda: Axiidea: Axiidae) obtained in the laboratory // J. Nat. Hist. 2014. Vol. 48, nos. 29–30. P. 1737–1769.
- Kornienko E.S., Korn O.M., Golubinskaya D.D. The number of zoeal stages in larval development of *Nihonotrypaea petalura* (Stimpson, 1860) (Decapoda: Axiidea: Callianassidae) from Russian waters of the Sea of Japan // Zootaxa. 2015. Vol. 3919, no. 2. P. 343–361.
- Miyabe S., Konishi K., Fukuda Y., Tamaki A. The complex larval development of the ghost shrimp, *Callianassa japonica* Ortmann, 1891 (Decapoda: Thalassinidea: Callianassidae), reared in the laboratory // Crust. Res. 1998. Vol. 27. P. 101–121.
- Paula J., Nogueira-Mendes R., Paci S. et al. Combined effects of temperature and salinity on the larval development of the estuarine mud prawn *Upogebia africana* (Crustacea, Thalassinidea) // Advances in decapod crustacean research. Proc. 7th Colloq. Crustacea Decapoda Mediterranea. 2001. P. 141–148.
- Pohle G., Santana W. Gebiidea and Axiidea (= Thalassinidea) // Atlas of crustacean larvae. Baltimore: John Hopkins Univ. Press. 2014. P. 263–271.
- Robles R., Tudge C.C., Dworschak P.C. et al. Molecular phylogeny of the Thalassinidea based on nuclear and mitochondrial genes // Decapod crustacean phylogenetics. Crustacean Issues. London; New York: CRC Press. 2009. No. 18. P. 309–326.
- Tsang L.M., Lin F.-J., Chu K.H., Chan T.-Y. Phylogeny of Thalassinidea (Crustacea, Decapoda) inferred from three rDNA sequences: implication for morphological evolution and superfamily classification // J. Zool. Syst. Evol. Res. 2008. Vol. 46, no. 3. P. 216–223.
- Webb G.E. The development of the species of *Upogebia* from Plymouth Sound // J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 1919. Vol. 12. P. 81–135.

ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ СОСТАВ, ХАРАКТЕРИСТИКА И НЕЙРОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРОФЛОРЫ, АССОЦИИРОВАННОЙ С НЕМЕРТИНАМИ ИЗ ЯПОНСКОГО МОРЯ*

© 2017 Д. И. Мельникова^{1,2}, И. А. Беленёва², А. П. Тюнин³, Т. Ю. Магарламов^{1,2}

¹Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета, Владивосток 690092;

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

³Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток 690022

e-mail: biotimur@yandex.ru

Статья принята к печати 26.01.2017 г.

Исследован таксономический состав бактерий, ассоциированных с двумя видами немертин (*Hubrechtella juliae*, *Lineus alborostratus*), содержащих тетродотоксин (ТТХ-содержащих), и с двумя видами немертин (*Quasitetrastemma stimpsoni*, *Malacobdella grossa*), не содержащих ТТХ, которые были собраны в зал. Петра Великого Японского моря. Идентификация проведена по результатам секвенирования последовательностей гена 16S рРНК и анализа фенотипических характеристик. В ходе исследования было выделено и охарактеризовано 38 штаммов гетеротрофных бактерий из восьми родов: *Pseudoalteromonas*, *Shewanella*, *Ruegeria*, *Pseudomonas*, *Deftuviococcus*, *Vibrio*, *Alteromonas* и *Bacillus*. Среди ассоциативной микрофлоры немертин преобладали бактерии, относящиеся к γ -Proteobacteria (76.3% от общего числа изолятов). Анализ чувствительности к разным классам антибиотиков выявил устойчивость 38 штаммов к трём или более антибиотикам. Антимикробную активность к одному и более индикаторным микроорганизмам проявляли 15 изолятов, большинство из них являлись представителями рода *Pseudoalteromonas*. Скрининг ТТХ-продуцирующих бактерий проводили с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии с использованием поликлональных антител против ТТХ. Из немертины *H. juliae* выявлен ТТХ-продуцирующий штамм *Pseudoalteromonas* sp. Установлена корреляция между наличием ТТХ-положительной микрофлоры и токсичностью немертин.

Ключевые слова: морские гетеротрофные бактерии, ассоциативная микрофлора, бактериальное разнообразие, немертины, тетродотоксин.

Taxonomic composition, characteristics and neurotoxic activity of ribbon worm-associated bacteria from sea of Japan. D. I. Melnikova^{1,2}, I. A. Beleneva², A. P. Tyunin³, T. Yu. Magarlamov^{1,2} (¹School of Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok 690092; ²A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology, National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041; ³Institute of Biology and Soil Science, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690022)

The taxonomic composition of bacteria associated with the two species of tetrodotoxin-bearing (TTX-bearing) (*Hubrechtella juliae*, *Lineus alborostratus*) and two species of non-TTX-bearing (*Quasitetrastemma stimpsoni*, *Malacobdella grossa*) ribbon worms collected from the Peter the Great Bay of Sea of Japan, was studied. Bacterial isolates were identified using 16S rRNA gene sequencing and phenotypic characteristics. Thirty-eight strains of heterotrophic bacteria from the eight genera: *Pseudoalteromonas*, *Shewanella*, *Ruegeria*, *Pseudomonas*, *Deftuviococcus*, *Vibrio*, *Alteromonas* and *Bacillus*, were isolated and characterized. γ -Proteobacteria dominated among the associated microflora of nemerteans (76.3% of the total number of isolates). The sensitivity analysis of 38 strains to antibiotics of various classes revealed multiple resistance to three or more antibiotics in all of the studied isolates. The 15 bacterial strains isolated in the present study exhibited antimicrobial activities against at least one of five indicator microorganisms, most of which were correspondent to *Pseudoalteromonas* genus. Screening of the TTX-producing bacteria was performed using confocal laser scanning microscopy and polyclonal antibodies. TTX-producing strain *Pseudoalteromonas* sp. was found in the nemertean *H. juliae*. The correlation between the presence of TTX-positive microflora and the toxicity of nemerteans was determined. (Biologiya Morya, 2017, vol. 43, no. 5, pp. 349–357).

Keywords: marine heterotrophic bacteria, associated microflora, bacterial diversity, nemerteans, tetrodotoxin.

Морские гидробионты являются богатым источником биологически активных веществ с антимикробной, цитотоксической и противоопухолевой активностью (Suleria et al., 2016). Среди веществ, обнаруженных в этих организмах, выделяют нейротоксины, широко

используемые в нейробиологии, фармакологии и медицине (Haefner, 2003). Тетродотоксин (ТТХ) – один из наиболее изучаемых низкомолекулярных токсинов, который относится к группе гуанидиновых нейротоксинов, избирательно блокирующих натриевые каналы в нерв-

*Таксономический состав микрофлоры четырех видов немертин исследован при финансовой поддержке ДВФУ (№ 14-08-06-19i) и Программы фундаментальных научных исследований "Дальний Восток" (№ 15-1-3-036). Скрининг бактерий, выделенных из немертин, на продукцию ТТХ выполнен при финансовой поддержке РНФ (№ 15-15-20026).

ных и мышечных клетках. Широкое распространение ТТХ в филогенетически различных группах организмов привело к созданию гипотезы о бактериальном происхождении токсина (Mosher, Fuhrman, 1984). Начиная с 1980-х годов, ТТХ-продуцирующие бактерии были выделены из красных водорослей, немертин, морских звезд, крабов, брюхоногих моллюсков, осьминогов, рыб фугу, а также из пресных водоёмов и морских донных осадков (Chau et al., 2011). Бактерии-продуценты ТТХ относятся к разным филогенетическим группам микроорганизмов: Proteobacteria (роды *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Raoultella*, *Roseobacter*, *Aeromonas*, *Shewanella*, *Plesiomonas*, *Alteromonas*, *Acinetobacter*, *Caulobacter*), Actinobacteria (роды *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Kytococcus*, *Cellulomonas*, *Actinomyces*, *Nocardiosis*, *Streptomyces*), Firmicutes (роды *Bacillus*, *Lysinibacillus*) и Bacteroidetes (роды *Flavobacterium*, *Tenacibaculum*) (Pratheepa, Vasconcelos, 2013).

Многие немертину содержат различные нейротоксины, которые используются ими для охоты и защиты от хищников (Kem, 1985). Для некоторых видов немертин было показано содержание экстремально высоких концентраций ТТХ (Asakawa et al., 2000, 2013). Так, Макэвой с соавторами (McEvoy et al., 1998) предположили, что ТТХ и его предшественники образуются в немертинах за счёт симбиотических или паразитических микроорганизмов. Кэрл с соавторами (Carroll et al., 2003) выделили ТТХ-продуцирующие вибрионы из семи видов немертин (*Cephalothrix rufifrons*, *Lineus longissimus*, *Lineus ruber*, *Lineus viridis*, *Ramphogordius sanguineus*, *Riseriellus occultus*, *Amphiporus lactifloreus*) и показали связь между бактериями и продукцией ТТХ. Однако в литературе отсутствуют сведения о таксономическом разнообразии и свойствах ассоциативной микрофлоры токсичных немертин, исследования микрофлоры нетоксичных видов немертин также не проводились. В связи с этим настоящая работа посвящена изучению свойств и особенностей таксономического состава культивируемых бактерий, ассоциированных с ТТХ-содержащими и нетоксичными немертинами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В исследовании использованы ТТХ-содержащие немертину *Hubrechtella juliae* и *Lineus alborostratus* и не содержащие токсины немертину *Quasitetrastremma stimpsoni* и *Malacobdella grossa*. Токсичность *H. juliae* была подтверждена иммуногистохимическими методами (Магарламов, Чернышев, неопубликованные данные), а токсичность *L. alborostratus* – иммуногистохимическими методами (Magarlamov et al., 2016), биотестами на мышах, высокоэффективной жидкостной хроматографией с масс-спектрометрией (ВЭЖХ–МС) и газовой хроматографией с масс-спектрометрией (ГХ–МС) (Asakawa et al., 2013). Отсутствие ТТХ и его аналогов в *M. grossa* было подтверждено иммуногистохимическими методами с использованием антител против ТТХ (Магарламов, Чернышев, неопубликованные данные); отсутствие токсинов в *Q. stimpsoni* было показано на видеодвойнике *Quasitetrastremma nigrifrons* (Zaslavskaya et al., 2010)

с помощью биотестов на мышах, ВЭЖХ–МС и ГХ–МС (Asakawa et al., 2013). Все виды немертин были собраны в зал. Восток (зал. Петра Великого Японского моря) в июне–августе 2015 г.: *L. alborostratus* – 12 июня, *H. juliae* – 4 июля, *M. grossa* – 20 июля, *Q. stimpsoni* – 8 августа. Животных содержали в аэрируемом аквариуме со стерильной морской водой в течение 7 сут. Далее каждый образец трижды тщательно отмывали стерильной морской водой. Общую пробу из пяти немертин растирали до гомогенного состояния в стерильном ручном гомогенизаторе (EMS, США) с соблюдением правил асептики; затем гомогенат разбавляли 0.154 М раствором NaCl до конечного объёма 1 мл (нативный гомогенат). Для получения отдельных колоний гомогенат в серийных разведениях высевали на чашки Петри с плотной средой Йошимуцу–Кимура (Y–K) (Beleneva et al., 2014). Посевы культивировали при температуре 23°C в течение 7 сут. Бактериальные изоляты трижды пересеивали на соответствующую среду для получения чистой культуры.

Были проведены стандартные тесты по ранее описанным методикам: тесты на реакцию по Граму, на подвижность, цитохромоксидазу, утилизацию источников углерода, образование кислых продуктов из углеводов, на устойчивость к антибиотикам, на потребность в ионах Na⁺, на рост при разных значениях температуры, pH и солёности (Beleneva et al., 2013). Гидролиз желатина и крахмала исследовали согласно прописи (Smibert, Krieg, 1994). Дополнительное биохимическое тестирование штаммов вибрионов выполнено с использованием тест-систем СИБ (Микроген, Россия), а остальных изолятов – систем API 20NE (bioMérieux, Франция). Идентификацию изолятов проводили на основе результатов анализа биохимических характеристик и секвенирования последовательностей гена 16S рПНК.

Общую ДНК выделяли из бактериальных штаммов модифицированным методом Эхта (Dubrovina et al., 2010). Таксономическую принадлежность бактериальных изолятов оценивали на основе анализа последовательностей гена 16S рПНК (Kiselev et al., 2013). Для амплификации последовательности гена 16S рПНК использовали следующие праймеры: p27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) и p1524r (5'-AAGGAGGTGATCCARCCGCA) (Lane, 1991). Реакцию амплификации проводили в объёме 20 мкл, содержащем 10 мМ Трис-HCl (pH 8.5), 50 мМ KCl, 2 мМ MgCl₂, 0.01% желатина, 0.1 мМ Тритон X-100, 0.2 мМ каждого из дНТФ, 0.2 мМ праймера и 1 ед. Таq-ДНК-полимеразы (Silex М, Россия). В качестве матрицы в реакции ПЦР использовали 20–60 нг ДНК. Термический цикл проводили в UNO Thermoblock (Biometa, Германия), запрограммированном на начальной стадии денатурации: 2 мин при 95°C, а затем 35 циклов: 20 с при 95°C, 20 с при 55°C, 2 мин при 72°C и окончательный цикл – при 72°C в течение 5 мин. ПЦР-продукты, соответствующие последовательности гена 16S рПНК, очищали этанолом и секвенировали генным анализатором ABI 3130 (Applied Biosystems, США) (Kiselev et al., 2013). Полученные фрагменты последовательностей генов 16S рПНК были депонированы в генбанк (NCBI/GenBank) под номерами KX233643–KX233683. Филогенетическое дерево построено методом объединения ближайших соседей ("neighbor-joining" method) (Saitou, Nei, 1987) с использованием программы ClustalX вер. 1.8 (Thompson et al., 1997). Для оценки топологии филогенетического дерева и стабильности кластеров использовали бутстреп-анализ с 1000 итераций в программе Mega 6 (Tamura et al., 2013).

Для выявления ТТХ-положительной микрофлоры в общих бактериальных смывах и ТТХ-положительных клетках в 38 выделенных штаммах использовали метод конфокальной лазер-

ной сканирующей микроскопии с поликлональными антителами против ТТХ (разведение 1: 25; Abnova, США). Для получения общего бактериального смыва 0.1 мл нативного гомогената каждого вида немертин высевали в чашки Петри с плотной средой Y-K и культивировали в течение 3 сут при температуре 23°C. Клетки отмывали с поверхности агара стерильной морской водой и осаждали на центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия) при 3000 g в течение 10 мин. Получившейся осадок фиксировали 4% раствором параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7.4). Скрининг на продукцию ТТХ общих бактериальных смывов и отдельных штаммов проводили согласно описанной ранее методике (Beleneva et al., 2014). Неиммунную сыворотку кролика и фосфатный буфер с добавлением 10% бычьего сывроточного альбумина использовали в качестве отрицательного контроля; каких-либо положительных свечений в контроле не наблюдали. Для исключения aberrантной автофлюоресценции образцы анализировали в фильтре 546.

Антимикробную активность изолятов в отношении типовых тест-культур *Escherichia coli* ATCC15034, *Bacillus subtilis* ВКМ В501, *Candida albicans* КММ 455, *Pseudomonas aeruginosa* КММ 433 и *Staphylococcus aureus* ATCC21027 анализировали в соответствии с описанной ранее методикой (Beleneva et al., 2013). Бактериальные штаммы хранили в криопробирках при –85°C на морской воде с 30% глицерина, 1% пептона (Difco, Китай) и MgSO₄ (3–5 г/л) в коллекции морских гетеротрофных бактерий Национального научного центра морской биологии ДВО РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе исследования было выделено и охарактеризовано 38 штаммов гетеротрофных бактерий: 21 штамм из *Quasitetrastemma stimpsoni*, 7 штаммов из *Lineus alborastratus*, 6 – из *Malacobdella grossa* и 4 штамма из *Hubrechtella juliae*. На основании фенотипических свойств бактерий и результатов филогенетического анализа изоляты были отнесены к трём филогенетическим группам: γ -Proteobacteria (76.3% от общего числа изолятов), α -Proteobacteria (7.9%) и Firmicutes (15.8%) (рис. 1). Среди выделенных штаммов преобладали грамотрицательные бактерии – 84.2% от общего числа изолятов. Они были представлены преимущественно *Pseudoalteromonas* spp. (18 штаммов) и *Shewanella* spp. (7 штаммов); минорными компонентами являлись *Ruegeria* spp. (2 штамма), *Pseudomonas* spp. (2 штамма) и по одному штамму из родов *Defluviicoccus*, *Vibrio* и *Alteromonas*. Все 6 грамположительных изолятов принадлежали роду *Bacillus*. По результатам анализа нуклеотидного состава участка гена 16S рРНК было показано, что все изолированные штаммы имели 99–100% сходство с близкородственными типовыми штаммами (рис. 1), последовательности которых для сравнения были взяты в GenBank (табл. 1). Только изолят *Defluviicoccus* sp. 1933 показал 98% сходство с *Defluviicoccus vanus* str. Ben; изолят *Bacillus* sp. 1941 оказался близок к *B. aerius* str. 24K и *B. altitudinis* str. 41KF2b.

Микрофлора, ассоциированная с *Q. stimpsoni*, была представлена главным образом родом *Pseudoalteromonas* (71.4% от общего числа штаммов); кроме штаммов рода *Pseudoalteromonas* были выявлены по два штамма *Bacillus*

spp., *Pseudomonas* spp. и *Shewanella* spp., а также один штамм *Vibrio* sp. В составе микрофлоры *L. alborastratus* обнаружены *Defluviicoccus* (1 штамм), *Bacillus* (3 штамма) и *Shewanella* (3 штамма). Бактерии, ассоциированные с *M. grossa*, принадлежали родам *Alteromonas* (1 штамм), *Ruegeria* (2 штамма) и *Pseudoalteromonas* (3 штамма). По одному представителю родов *Pseudoalteromonas* и *Bacillus* и два штамма *Shewanella* spp. выявлены в *H. juliae*.

Сравнение последовательностей гена 16S рРНК с данными NCBI/GenBank показало, что штаммы 2130 и 2132, обнаруженные в немертинах *L. alborastratus* и *Q. stimpsoni*, близки штамму *B. aerius* str. 24K. Штаммы 1819, 1827 и 2099, близкородственные штамму *Pseudoalteromonas arctica* str. A37-1-2, были выделены из немертин *Q. stimpsoni* и *M. grossa*. Штаммы, близкие *Shewanella baltica* str. OS155, были выделены из немертин *H. juliae* и *L. alborastratus*. Штамм 1942, выделенный из *H. juliae*, и штамм 2138, выделенный из *Q. stimpsoni*, показали 100% сходство с морскими изолятами *Pseudoalteromonas tetraodonis* IAM 14160 и *P. tetraodonis* str. NBRC103034 соответственно.

Штаммы *Pseudoalteromonas* spp., как правило, формировали бледно-жёлтые колонии, при этом были выявлены штаммы с тёмно-коричневым и бежевым пигментом. Клетки представляли собой прямые и изогнутые палочки разной длины. Бактерии имели цитохромоксидазу и амилазу, не ферментировали глюкозу, для роста нуждались в ионах Na⁺; аргинин дигидролаза, нитратредуктаза отсутствовали. Половина штаммов имела желатиназу. Бактерии рода *Shewanella* формировали бежевые колонии; клетки представляли собой короткие или средней длины палочки с закругленными концами. Все изоляты имели цитохромоксидазу, желатиназу, ферментировали глюкозу и росли на среде с содержанием NaCl от 0 до 6%. Индивидуальные отличия штаммов заключались в наличии или отсутствии нитратредуктазы и в потребности в ионах Na⁺ для роста в среде.

Изоляты 1836 и 2134 *Pseudomonas* sp. формировали непигментированные колонии. Клетки в виде палочек средней длины имели тёмные включения. Бактерии не ферментировали глюкозу, имели цитохромоксидазу, желатиназу, аргинин дигидролазу и нитратредуктазу; росли при концентрации NaCl от 0 до 6%. Единственный штамм *Vibrio* sp. формировал непигментированные колонии. Клетки были короткими, изогнутыми, с закругленными концами. Штамм характеризовался факультативно анаэробным типом метаболизма, имел цитохромоксидазу и каталазу, а также нуждался в ионах Na⁺ для роста и был чувствителен к вибриостатическому агенту 0-129 (Oxoid) в концентрации 10 и 150 мкг. Штамм 1933 *Defluviicoccus* sp. обладал ярко-оранжевым пигментом и формировал короткие с закругленными концами клетки. Бактерии имели окислительный тип метаболизма, обладали цитохромоксидазой, гидролизировали желатин, но не крахмал, и не росли без ионов Na⁺. Единственный представитель

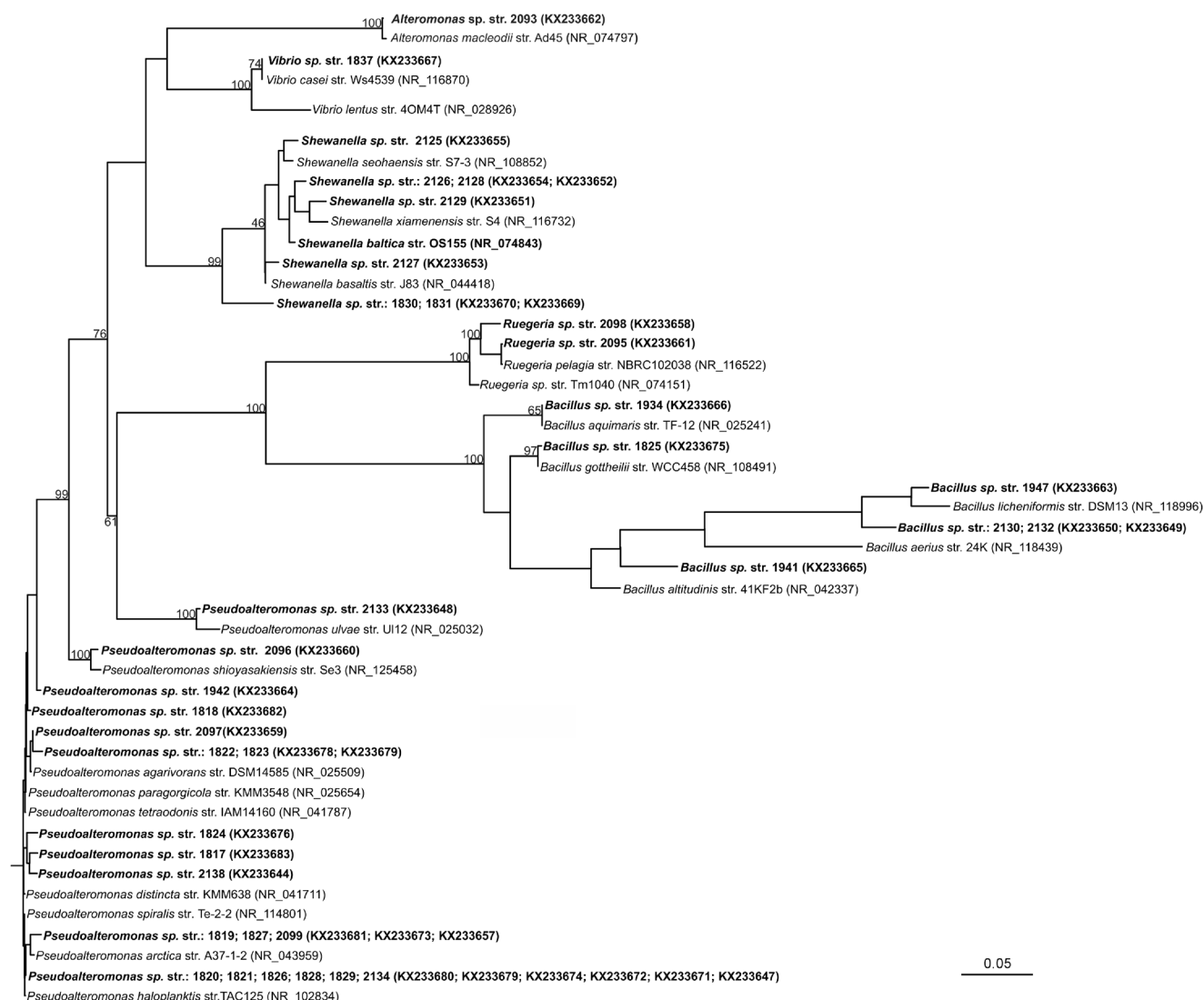


Рис. 1. Филогенетическое дерево бактериальных изолятов, выделенных из немертин (жирный шрифт) и родственных им бактерий, построенное на основе последовательности гена 16S рПНК методом объединения ближайших соседей.

рода *Alteromonas* штамм 2093 имел бесцветные колонии и длинные изогнутые клетки с закругленными концами. Позитивный по цитохромоксидазе штамм не ферментировал глюкозу, не гидролизировал желатин и крахмал, не обладал нитратредуктазой, для роста нуждался в ионах Na^+ . Штаммы *Ruegeria* 2095 и 2098 были непигментированными короткими палочками, обладали цитохромоксидазой, не окисляли глюкозу на среде Хью-Лейфсона и росли при концентрации NaCl в среде от 3 до 6%. Штаммы *Bacillus* spp. формировали в основном бежевые колонии, однако встречались штаммы с жёлтым и оранжевым пигментом. Бактериальные клетки представляли собой подвижные палочки с закруглёнными концами, способные к спорообразованию. Они имели цитохромоксидазу и желатиназу, не гидролизировали крахмал и нуждались в NaCl для роста в среде. Индивидуальные отличия штаммов – наличие или отсутствие нитратредуктазы и амилазы.

Антимикробную активность изолятов исследовали в отношении пяти тестовых культур микроорганизмов

(табл. 2). Из выделенных изолятов 15 показали активность в отношении хотя бы одной тестовой культуры. *Pseudoalteromonas* sp. 2133 ингибировал рост трех культур. Пять штаммов *Pseudoalteromonas* spp. (1817, 1818, 1820, 1826, 2099), *Shewanella* sp. 2125 и *Ruegeria* sp. 2029 проявили активность в отношении двух тестовых культур. Большинство активных в отношении тестовых культур штаммов было изолировано из *Q. stimpsoni* и принадлежало роду *Pseudoalteromonas* (10 штаммов). Все изученные изоляты независимо от таксономического положения проявили полирезистентность к антибиотикам (табл. 2). Большинство штаммов показало устойчивость к β -лактамам (ампициллин, пенициллин, карбенициллин, оксациллин) и линкомицину.

Методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии с использованием поликлональных антител против ТТХ было установлено наличие ТТХ-положительных бактериальных клеток в микрофлоре *H. juliae* и *L. alborostratus* (рис. 2А, Б). Какие-либо ТТХ-положи-

Таблица 1. Таксономическое положение бактериальных штаммов, ассоциированных с немертинами *Hubrechtella juliae*, *Lineus alborostratus*, *Quasitetrastemma stimpsoni* и *Malacobdella grossa*, на основании анализа нуклеотидного состава участка гена 16S рРНК

Номер штамма	Номер в GenBank	Близкородственный организм	Идентичность, %
<i>Quasitetrastemma stimpsoni</i>			
1817	KX233683	<i>Pseudoalteromonas spiralis</i> str. Te-2-2 (NR_114801)	99
1818	KX233682	<i>Pseudoalteromonas paragorgicola</i> str. KMM3548 (NR_025654)	99
1819	KX233681	<i>Pseudoalteromonas arctica</i> str. A37-1-2 (NR_043959)	100
1820	KX233680	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> str. TAC125 (NR_102834)	100
1821	KX233679	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> str. TAC125 (NR_102834)	99
1822	KX233678	<i>Pseudoalteromonas hodoensis</i> str. H7 (NR_126232)	99
1823	KX233677	<i>Pseudoalteromonas hodoensis</i> str. H7 (NR_126232)	99
1824	KX233676	<i>Pseudoalteromonas distincta</i> str. KMM638 (NR_041711)	99
1825	KX233675	<i>Bacillus gottheilii</i> str. WCC458 (NR_108491)	99
1826	KX233674	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> str. TAC125 (NR_102834)	100
1827	KX233673	<i>Pseudoalteromonas arctica</i> str. A37-1-2 (NR_043959)	100
1828	KX233672	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> str. TAC125 (NR_102834)	99
1829	KX233671	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> str. TAC125 (NR_102834)	100
1830	KX233670	<i>Shewanella halifaxensis</i> str. HAW-EB4 (NR_074822)	99
1831	KX233669	<i>Shewanella halifaxensis</i> str. HAW-EB4 (NR_074822)	100
1836	KX233668	<i>Pseudomonas guineae</i> str. M8P (NR_042607)	100
1837	KX233667	<i>Vibrio casei</i> str. Ws4539 (NR_116870)	100
2132	KX233649	<i>Bacillus aerius</i> str. 24K (NR_118439)	100
2133	KX233648	<i>Pseudoalteromonas ulvae</i> str. U112 (NR_025032)	99
2134	KX233647	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> str. TAC125 (NR_102834)	100
2138	KX233644	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i> str. NBRC103034 (NR_114187)	100
<i>Lineus alborostratus</i>			
1933	–	<i>Deftuviococcus vanus</i> str. Ben (NR_041771)	98
1934	KX233666	<i>Bacillus aquimaris</i> str. TF-12 (NR_025241)	100
1941	KX233665	<i>Bacillus aerius</i> str. 24K (NR_118439) <i>Bacillus altitudinis</i> str. 41KF2b (NR_042337)	100
2127	KX233653	<i>Shewanella basaltis</i> str. J83 (NR_044418)	99
2128	KX233652	<i>Shewanella baltica</i> str. OS155 (NR_074843)	100
2129	KX233651	<i>Shewanella xiamenensis</i> str. S4 (NR_116732)	99
2130	KX233650	<i>Bacillus aerius</i> str. 24K (NR_118439)	100
<i>Malacobdella grossa</i>			
2093	KX233662	<i>Alteromonas macleodii</i> str. Ad45 (NR_074797)	99
2095	KX233661	<i>Ruegeria pelagia</i> str. NBRC102038 (NR_116522)	99
2096	KX233660	<i>Pseudoalteromonas shioyasakiensis</i> str. Se3 (NR_125458)	99
2097	KX233659	<i>Pseudoalteromonas agarivorans</i> str. DSM14585 (NR_025509)	99
2098	KX233658	<i>Ruegeria</i> sp. str. Tm1040 (NR_074151)	99
2099	KX233657	<i>Pseudoalteromonas arctica</i> str. A37-1-2 (NR_043959)	99
<i>Hubrechtella juliae</i>			
1942	KX233664	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i> str. IAM14160 (NR_041787)	99
1947	KX233663	<i>Bacillus safensis</i> isolate PSB5 (LT703514)	100
2125	KX233655	<i>Shewanella seohaensis</i> str. S7-3 (NR_108852)	99
2126	KX233654	<i>Shewanella baltica</i> str. OS155 (NR_074843)	99

Примечание. "–" – штамм не депонирован в GenBank.

Таблица 2. Антимикробная активность и антибиотико-устойчивость изолятов немертин

Штамм	Род	Антибиотико-устойчивость	Антимикробная активность в отношении тестовых культур
<i>Quasitetrastemma stimpsoni</i>			
1825	<i>Bacillus</i>	CfzCipEryOI TetLin Lev	–
2132	<i>Bacillus</i>	PenCfzCipGenEryOI TetLin Lev RifPol	–
1817	<i>Pseudoalteromonas</i>	PenOxCarbCfzLin	<i>Candida albicans</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1818	<i>Pseudoalteromonas</i>	PenOxCfzCipLinGen	<i>C. albicans</i> , <i>P. aeruginosa</i>
1819	<i>Pseudoalteromonas</i>	PenOxCarbCfzCipLinOI	–
1820	<i>Pseudoalteromonas</i>	PenAmpOxCarbCfzStrGenEryTetLinRif	<i>C. albicans</i> , <i>Bacillus subtilis</i>
1821	<i>Pseudoalteromonas</i>	PenOxCarbCfzLinRif	<i>C. albicans</i>
1822	<i>Pseudoalteromonas</i>	PenOxCarbCfzLinRif	<i>P. aeruginosa</i>
1823	<i>Pseudoalteromonas</i>	PenAmpOxCarbCfzTetLinRif	–
1824	<i>Pseudoalteromonas</i>	PenOxCarbCfzGenLinRif	<i>C. albicans</i>
1826	<i>Pseudoalteromonas</i>	PenAmpOxCarbCfzGenOILinRifPol	<i>C. albicans</i> , <i>P. aeruginosa</i>
1827	<i>Pseudoalteromonas</i>	PenOxCarbCfzEryOILin	–
1828	<i>Pseudoalteromonas</i>	PenAmpOxCarbCfzCipStrGenTetLinLevRif	<i>C. albicans</i>
1829	<i>Pseudoalteromonas</i>	PenAmpOxCarbCfzCipXGenTetLin	–
2133	<i>Pseudoalteromonas</i>	PenAmpOxCarbTetLin	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>B. subtilis</i>
2134	<i>Pseudoalteromonas</i>	PenAmpOxCarbCfzTetLin	–
2138	<i>Pseudoalteromonas</i>	PenAmpOxCarbCfzTetLin	<i>B. subtilis</i>
1836	<i>Pseudomonas</i>	PenOxCarbCfzEryOILin	–
1830	<i>Shewanella</i>	PenAmpOxCarbCfzCipStrGenEryOI TetLinRif	–
1831	<i>Shewanella</i>	PenAmpOxCarbCfzCipGenEryOI TetLinRifPol	–
1837	<i>Vibrio</i>	PenAmpOxCarbCfzCipGenEryOILinRif	–
<i>Lineus alborostratus</i>			
1934	<i>Bacillus</i>	CfzCipXStrOILin	–
1941	<i>Bacillus</i>	CfzCipX EryOI TetLin Lev RifPol	–
2130	<i>Bacillus</i>	CfzLinLevPol	<i>C. albicans</i>
1933	<i>Defluviicoccus</i>	CarbCfzStrGenOILin	–
2127	<i>Shewanella</i>	PenAmpOxCarbCfzTetLinLevRif	–
2128	<i>Shewanella</i>	PenAmpOxCarbCfzEryOI TetLinRifPol	–
2129	<i>Shewanella</i>	PenAmpOxCarbCfzOI TetLinLevRif	–
<i>Malacobdella grossa</i>			
2093	<i>Alteromonas</i>	PenOxCarbCfzOILinRifPol	–
2096	<i>Pseudoalteromonas</i>	PenAmpOxCarbCfzTetLin	–
2097	<i>Pseudoalteromonas</i>	PenAmpOxCfzTetLin	–
2099	<i>Pseudoalteromonas</i>	PenAmpOxCarbCfzTetLin	<i>B. subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i>
2095	<i>Ruegeria</i>	PenAmpStrGenOI TetLinRif	<i>C. albicans</i> , <i>B. subtilis</i>
2098	<i>Ruegeria</i>	PenAmpEryOI TetLin	<i>C. albicans</i>
<i>Hubrechtella juliae</i>			
1947	<i>Bacillus</i>	EryOI TetLinLevRifPol	–
1942	<i>Pseudoalteromonas</i>	OxOI TetLin	–
2125	<i>Shewanella</i>	PenAmpOxCarbCfzEryTetLinPol	<i>C. albicans</i> , <i>B. subtilis</i>
2126	<i>Shewanella</i>	PenAmpOxCarbCfzCipStrGenEryOI TetLinLevRifPol	–

П р и м е ч а н и е. Pen – пенициллин (6 мкг); Amp – ампициллин (10 мкг); Ox – оксациллин (5 мкг); Carb – карбенициллин (100 мкг); Cfz – цефтазидим (30 мкг); Cip – ципрофлоксацин (5 мкг); Str – стрептомицин (25 мкг); Gen – гентамицин (10 мкг); Ery – эритромицин (15 мкг); OI – олеандомицин (15 мкг); Tet – тетрациклин (30 мкг); Lin – линкомицин (15 мкг); Lev – левомицетин (30 мкг); Rif – рифампицин (30 мкг); Pol – полимиксин (300 ед.).

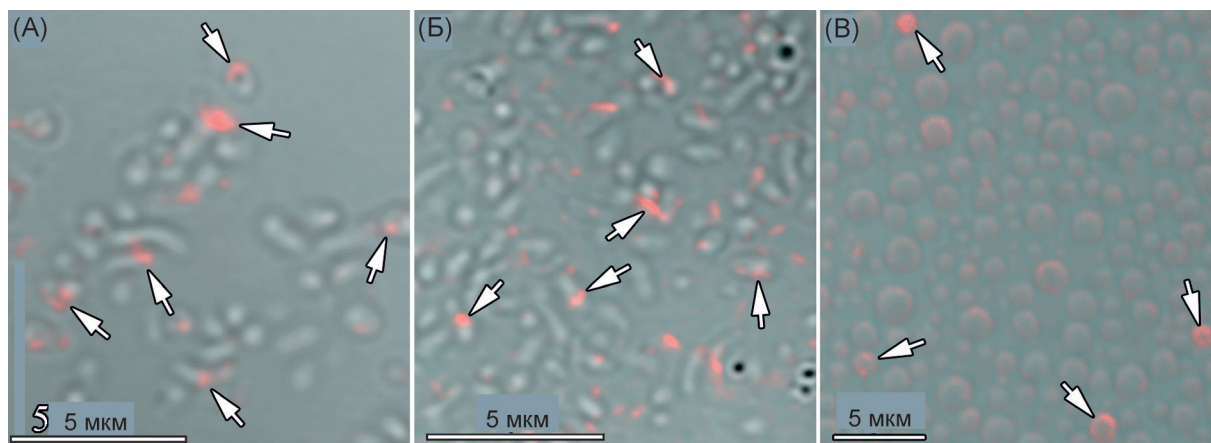


Рис. 2. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (Z-проекция) общей бактериальной культуры *Lineus alborostratus* (А), *Hubrechtella juliae* (Б) и штамма *Pseudoalteromonas* sp. 1942 (В), окрашенной антителами против ТТХ. Стрелки указывают на ТТХ-положительные бактериальные клетки.

тельные клетки в микрофлоре *M. grossa* и *Q. stimpsoni* отсутствовали. Из 38 бактериальных изолятов ТТХ-положительные клетки были выявлены только в штамме *Pseudoalteromonas* sp. 1942, выделенном из *H. juliae* (рис. 2В).

ОБСУЖДЕНИЕ

Преобладание в составе ассоциированной с немертинами микрофлоры видов, принадлежащих к γ -Proteobacteria, согласуется с данными о составе морских микробных сообществ (Giovannoni, Rappe, 2000). Во всех немертинах, за исключением *Lineus alborostratus*, обнаружены бактерии рода *Pseudoalteromonas*, характерные для ассоциативной микрофлоры морских беспозвоночных животных (Romanenko et al., 2008). В свободноживущих немертинах *Hubrechtella juliae*, *Quasitetrastremma stimpsoni* и *L. alborostratus* обнаружены представители родов *Bacillus* и *Shewanella*. В отличие от свободноживущих видов, в немертине *Malacobdella grossa* – симбионте двустворчатых моллюсков рода *Mya*, не обнаружено бактерий рода *Bacillus*. Хотя бактерии рода *Bacillus* чаще встречаются в донных осадках, чем в воде и ассоциациях с животными, они также были выделены из некоторых ТТХ-содержащих организмов: осьминога *Napalochlaena maculosa* и нескольких видов рыбы фугу (*Fugu rubripes*, *F. obscurus*, *Arothron hispidus*) (Pratheepa, Vasconcelos, 2013).

Фенотипические свойства штаммов, ассоциированных с немертинами, соответствовали таковым, характерным для представителей родов *Pseudoalteromonas*, *Alteromonas*, *Pseudomonas* (Mikhailov et al., 2002), *Bacillus* (Ivanova et al., 1999), *Shewanella* (Venkateswaran et al., 1999), *Vibrio* (Thompson et al., 2004), *Deftuviicoccus* (Maszenan et al., 2005) и *Ruegeria* (Lee et al., 2007). Из 38 выделенных из немертин штаммов 15 проявили антимикробную активность, что согласуется с данными о широком распространении микробного антагонизма в морской среде (Long, Azam, 2001). Антибактериаль-

ная активность среди морских микроорганизмов характерна для представителей родов *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium* и *Alteromonas* (Sinimol et al., 2016). Как отмечают Лонг и Азам (Long, Azam, 2001), наиболее активными продуцентами антимикробных веществ являются морские пелагические γ -протеобактерии из отрядов Alteromonadales и Vibrionales, что подтверждается результатами, полученными в данном исследовании. Большинство проявивших антимикробную активность изолятов относится к роду *Pseudoalteromonas*.

Из морской среды регулярно выделяют антибиотико-устойчивые штаммы микроорганизмов, относящиеся к аллохтонной и аутохтонной микрофлоре. Увеличение содержания антибиотических веществ и антибиотико-устойчивых микроорганизмов в океанах обусловлено антропогенным воздействием. Это сброс бытовых отходов, бурное развитие аквакультуры и другие факторы (Baquero et al., 2008). Изначально чувствительные штаммы микроорганизмов становятся устойчивыми к антимикробным агентам за счёт приобретения новых генов в результате горизонтального переноса или рекомбинации генов (Wintersdorff et al., 2016). Распределение антибиотико-устойчивых бактерий в морских экосистемах в основном исследуют в пределах рыбных хозяйств и объектов марикультуры (Zhang et al., 2011). Мультирезистентность выделенных из немертин штаммов отражает общую тенденцию и, вероятно, связана с повышенной антропогенной нагрузкой в зал. Петра Великого Японского моря.

Морские изоляты *Pseudoalteromonas tetraodonis* IAM 14160 и *P. tetraodonis* str. NBRC103034, имеющие 100% генетическое сходство с выделенными нами штаммами 1942 и 2138, способны продуцировать ТТХ в симбиозе с организмом хозяина (Ivanova et al., 2001). Высказано предположение о наличии подобных ассоциативных взаимоотношений в сочетании с синтезом ТТХ также для микрофлоры немертин. Так, Кэрл

с соавторами (Carroll et al., 2003) показали, что концентрация ТТХ в экстрактах из вторичных высевов бактерий, выделенных из немертин, была значительно меньше, чем в первичных посевах. Они предположили, что для синтеза ТТХ бактерии нуждаются в веществах из тканей организма или эпидермальной слизи животного-хозяина. В нашем исследовании только штамм *Pseudoalteromonas* sp. 1942 оказался способен синтезировать ТТХ при выращивании на стандартных микробиологических средах в отсутствие компонентов тела немертины. ТТХ-положительные клетки были выявлены в общих бактериальных смывах из немертин *H. juliae* и *L. alborostratus*. В культивируемой микрофлоре немертин *Q. stimpsoni* и *M. grossa* ТТХ-положительные бактериальные клетки не обнаружены. Асакава с соавторами (Asakawa et al., 2013) показали наличие ТТХ и его аналогов в *L. alborostratus*, а также отсутствие токсинов в *Quasitetrastemma nigrifrons* и *Malacobdella japonica*. Отсутствие ТТХ-подобных токсинов в тканях *M. grossa* было показано иммуногистохимическими методами с использованием антител против ТТХ (Магарламов, Чернышев, неопубликованные данные). Виды рода *Hubrechtella* на наличие ТТХ-подобных веществ исследованы не были, однако методами иммуногистохимии с использованием антител против ТТХ в *H. juliae* были выявлены ТТХ-положительные клетки в стенке тела и в железистом эпителии хобота (Магарламов, Чернышев, неопубликованные данные). Полученные результаты указывают на взаимосвязь между присутствием ТТХ-положительной микрофлоры и наличием ТТХ-подобных токсинов в немертинах.

Первичные бактериальные высевы позволяют оценить наличие ТТХ-положительной микрофлоры, но не позволяют определить, какие именно штаммы обладают ТТХ-положительной меткой, так как многие ассоциативные бактерии теряют способность к росту и синтезу токсина вне организма хозяина при дальнейших пересевах, необходимых для их идентификации. Однако обнаружение культивируемого ТТХ-продуцирующего штамма *Pseudoalteromonas* sp. 1942 в немертине *H. juliae* в настоящем исследовании, штамма *Bacillus* sp. 1839, продуцирующего токсин, в немертине *Cephalothrix simula* (Beleneva et al., 2014; Shokur et al., 2016), а также ТТХ-положительных вибрионов в нескольких видах немертин (Carroll et al., 2003) указывает на то, что микрофлора токсичных немертин является перспективным источником для поиска ТТХ-продуцентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Asakawa M., Ito K., Kajihara H. Highly toxic ribbon worm *Cephalothrix simula* containing tetrodotoxin in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan // *Toxins*. 2013. Vol. 5, no. 2. P. 376–395.
- Asakawa M., Toyoshima T., Shida Y. et al. Paralytic toxins in a ribbon worm *Cephalothrix* species (Nemertean) adherent to cultured oysters in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan // *Toxicon*. 2000. Vol. 38, no. 6. P. 763–773.
- Baquero F., Martínez J.L., Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2008. Vol. 19, no. 3. P. 260–265.
- Beleneva I.A., Kikhlevsky A.D., Kharchenko U.V. Antimicrobial activity of heterotrophic bacterial strains of marine origin // *Jundishapur J. Microbiol.* 2013. Vol. 6, no. 2. P. 166–175.
- Beleneva I.A., Magarlamov T. Yu., Kikhlevsky A.D. Characterization, identification, and screening for tetrodotoxin production by bacteria associated with the ribbon worm (*Nemertea*) *Cephalothrix simula* (Ivata, 1952) // *Microbiology*. 2014. Vol. 83, no. 3. P. 220–226.
- Carroll S., McEvoy E.G., Gibson R. The production of tetrodotoxin-like substances by nemertean worms in conjunction with bacteria // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2003. Vol. 288, no. 1. P. 51–63.
- Chau R., Kalaitzis J.A., Neilan B.A. On the origins and biosynthesis of tetrodotoxin // *Aquat. Toxicol.* 2011. Vol. 104, no. 1–2. P. 61–72.
- Dubrovina A.S., Manyakhin A.Y., Zhuravlev Y.N., Kiselev K.V. Resveratrol content and expression of phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase genes in *rolC* transgenic cell cultures of *Vitis amurensis* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. Vol. 88, no. 3. P. 727–736.
- Giovannoni S., Rappe M. Evolution, diversity, and molecular ecology of marine prokaryotes. Microbial ecology of the oceans. New York: Wiley-Liss. 2000. P. 47–84.
- Haefner B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates // *Drug Discov. Today*. 2003. Vol. 8, no. 12. P. 536–544.
- Ivanova E.P., Romanenko L.A., Matté M.H. et al. Retrieval of the species *Alteromonas tetraodonis* Simidu et al. 1990 as *Pseudoalteromonas tetraodonis* comb. nov. and emendation of description // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001. Vol. 51, no. 3. P. 1071–1078.
- Ivanova E.P., Ysotskii M.V., Svetashev V.I. et al. Characterization of *Bacillus* strains of marine origin // *Int. Microbiol.* 1999. Vol. 2, no. 4. P. 267–271.
- Kem W.R. Structure and action of nemertine toxins // *Amer. Zool.* 1985. Vol. 25, no. 1. P. 99–111.
- Kiselev K.V., Ageenko N.V., Kurilenko V.V. Involvement of the cell-specific pigment genes *pks* and *sult* in the bacteria defense response of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* // *Dis. Aquat. Organ.* 2013. Vol. 103, no. 2. P. 121–132.
- Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Chichester: John Wiley and Sons. 1991. P. 115–175.
- Lee K., Choo Y.J., Giovannoni S.J., Cho J.C. *Ruegeria pelagia* sp. nov., isolated from the Sargasso Sea, Atlantic Ocean // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007. Vol. 57, no. 8. P. 1815–1818.
- Long R., Azam F. Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. Vol. 67, no. 11. P. 4975–4983.
- Magarlamov T. Yu., Shokur O.A., Chernyshev A.V. Distribution of tetrodotoxin in the ribbon worm *Lineus alborostratus* (Takakura, 1898) (Nemertea): immunoelectron and immunofluorescence studies // *Toxicon*. 2016. Vol. 112. P. 29–34.
- Maszenan A.M., Seviour R.J., Patel B.K. et al. *Deftuvicoccus vanus* gen. nov., sp. nov., a novel Gram-negative coccus/coccobacillus in the 'Alphaproteobacteria' from activated sludge // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005. Vol. 55, no. 5. P. 2105–2111.
- McEvoy E.G., Rogers A., Gibson R. Preliminary investigation of *Vibrio alginolyticus*-like bacteria associated with marine nemerteans // *Hydrobiologia*. 1998. Vol. 365, no. 1. P. 287–290.
- Mikhailov V.V., Romanenko L.A., Ivanova E.P. The genus *Alteromonas* and related Proteobacteria. The prokaryotes. Release 3.10: 3rd ed. New York: Springer. 2002. Vol. 6. P. 597–645.

- Mosher H.S., Furhman F.A. Occurrence and origin of tetrodotoxin // Seafood Toxins. Washington, D.C.: Amer. Chem. Soc. 1984. P. 333–344.
- Pratheepa V., Vasconcelos V. Microbial diversity associated with tetrodotoxin production in marine organisms // Environ. Toxicol. Pharmacol. 2013. Vol. 36, no. 3. P. 1046–1054.
- Romanenko L.A., Uchinob M., Kalinovskaya N.I., Mikhailov V.V. Isolation, phylogenetic analysis and screening of marine mollusc-associated bacteria for antimicrobial, hemolytic and surface activities // Microbiol. Res. 2008. Vol. 163, no. 6. P. 663–644.
- Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. Vol. 4, no. 4. P. 406–425.
- Shokur O.A., Magarlamov T. Yu., Melnikova D.I. et al. Life cycle of tetrodotoxin-producing *Bacillus* sp. on solid and liquid medium: light and electron microscopy studies // Russ. J. Mar. Biol. 2016. Vol. 42, no. 3. P. 252–257.
- Sinimol S., Sarika A.R., Jayakumaran N.A. Diversity and antagonistic potential of marine microbes collected from south-west coast of India // 3 Biotech. 2016. Vol. 6, no. 1. P. 7.
- Smibert R.M., Krieg N.R. Phenotypic characterization // Methods for general and molecular bacteriology. Washington, D.C.: Amer. Soc. Microbiol. 1994. P. 607–655.
- Suleria H.A.R., Gobe G., Masci P., Osborne S.A. Marine bioactive compounds and health promoting perspectives; innovation pathways for drug discovery // Trends Food Sci. Technol. 2016. Vol. 50. P. 44–55.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // Mol. Biol. Evol. 2013. Vol. 30, no. 12. P. 2725–2729.
- Thompson F.L., Iida T., Swings J. Biodiversity of vibrios // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2004. Vol. 68, no. 3. P. 403–431.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F. et al. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools // Nucl. Acids Res. 1997. Vol. 25, no. 24. P. 4876–4882.
- Venkateswaran K., Moser D.P., Dollhopf M.E. et al. Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1999. Vol. 49, no. 2. P. 705–724.
- von Wintersdorff C.J.H., Penders J., van Niekerk J.M. et al. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer // Front. Microbiol. 2016. Vol. 9, no. 7. P. 173.
- Youshimizu M., Kimura T. Study on the intestinal microflora of salmonids // Fish Pathol. 1976. Vol. 10. P. 243–259.
- Zaslavskaya N.I., Akhmatova A.F., Chernyshev A.V. Allozyme comparison of the species and colour morphs of the nemertean genus *Quasitetrastremma* Chernyshev, 2004 (Hoplonemertea: Tetrastemmatidae) from the Sea of Japan // J. Nat. Hist. 2010. Vol. 44, no. 37–40. P. 2303–2320.
- Zhang Y.B., Li Y., Sun X.L. Antibiotic resistance of bacteria isolated from shrimp hatcheries and cultural ponds on Donghai Island, China // Mar. Pollut. Bull. 2011. Vol. 62, no. 11. P. 2299–2307.

ФЕРМЕНТЫ БАКТЕРИАЛЬНОГО ИЗОЛЯТА БУРОЙ ВОДОРОСЛИ *SARGASSUM POLYCYSTUM* AGARDH, 1821, УЧАСТВУЮЩИЕ В БИОТРАНСФОРМАЦИИ ПОЛИАНИОННЫХ ОЛИГО- И ПОЛИСАХАРИДОВ*

© 2017 Ю. В. Дубровская¹, В. В. Куриленко¹, Као Тхи Тхуи Ханг², Буи Минг Ли², И. Ю. Бакунина¹, Т. Н. Звягинцева¹, В. В. Михайлов¹

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

²Нячангский институт научных и прикладных технологий, Нячанг, Вьетнам

e-mail: 1burtseva@piboc.dvo.ru; 2bminhly@dng.vnn.vn

Статья принята к печати 26.01.2017 г.

Поиск ферментов, участвующих в трансформации полианионных полисахаридов (фукоиданов и альгиновых кислот), был проведен среди бактериальных эпифитов бурых водорослей рода *Sargassum*, произрастающих в территориальных водах Социалистической Республики Вьетнам. Из микрофлоры водорослей выделены два устойчивых штамма F10 и F14, различающихся по морфологическим, физиологическим, биохимическим характеристикам и составу ферментов. Изучена способность штаммов синтезировать внутриклеточные олиго-, полисахарид гидролазы и альгинат лиазы; подобраны среды для оптимального роста штамма F14, биосинтеза фукоиданазы и полиманнуронат-специфичной альгинат лиазы. Частично очищенная альгинат лиаза полностью сохраняла активность до температуры 40°C, имела оптимум действия при pH 6.0 и температуре 35°C.

Ключевые слова: фукоидан, альгиновая кислота, фукоиданаза, полиманнуронат, альгинат лиаза, морские бактерии, бурые водоросли, род *Sargassum*.

The enzymes of marine bacterial isolate from the brown alga *Sargassum polycystum* Agardh, 1821, catalyzing the transformation of polyanionic oligo- and polysaccharides. Yu. V. Dubrovskaya¹, V. V. Kurilenko¹, Cao Thi Thuy Hang², Bui Minh Ly², I. Yu. Bakunina¹, T. N. Zvyagintseva¹, V. V. Mikhailov¹ (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690022; ²Nhatrang Institute of Technology Research and Application, Vietnamese Academy of Science and Technology, Nhatrang, Vietnam)

A search for enzymes involved in the degradation of polyanionic polysaccharides (fucoidans and alginic acid) was conducted among bacterial epiphytes of the brown alga *Sargassum polycystum* that grows in the territorial waters of the Socialist Republic of Vietnam. Two resistant bacterial strains F10 and F14 were isolated from the algal microflora, which degraded the thallus of the alga under laboratory conditions. These bacterial strains differed in the morphological, physiological, and biochemical characteristics and in the composition of enzymes. The strains were studied for the ability to synthesize intracellular oligo- and polysaccharide hydrolases and alginate lyases. The optimal conditions for the growth of the bacterial strain F14 and the biosynthesis of fucoidanase and polymannuronate-specific alginate lyase were determined. The partially purified alginate lyase was stable at a temperature of up to 40°C and had an optimal pH of 6.0 and an optimal temperature of 35°C. (Biologiya Morya, 2017, vol. 43, no. 5, pp. 358–365).

Keywords: fucoidan, alginic acid, fucoidanase, polymannuronate, alginate lyase, marine bacteria, brown algae, genus *Sargassum*.

Представители рода *Sargassum*, относящиеся к бурым водорослям, являются наиболее массовыми и широко распространенными в Мировом океане. В территориальных водах Социалистической Республики Вьетнам произрастает около 60 видов водорослей рода *Sargassum* (см.: Nguyen, 1997). Их используют в сельском хозяйстве, пищевой промышленности, народной медицине и косметологии. Саргассовые водоросли – богатейший источник альгиновых кислот и фукоиданов (Huynh, Nguyen, 1998). В настоящее время ведётся интенсивное исследование структуры, функции и биологического действия полисахаридов этих водорослей (Itoh et al., 1993; Zhua et al., 2004;

Josephine et al., 2007), причем особый интерес представляют альгиновые кислоты (Yabur et al., 2007; Fenoradosoa et al., 2010) и фукоиданы (Kusaykin et al., 2008). Дegradацию полианионных полисахаридов бурых водорослей из-за разнообразия их структур осуществляют как альгинат лиазы, так и фукоиданазы с различной субстратной специфичностью (Wong et al., 2000; Kusaykin et al., 2008; Wang et al., 2015). Альгинат лиазы катализируют расщепление альгиновой кислоты по механизму α, β-элиминирования 4-О-гликозидной связи между C4 и C5 с образованием 4-дезоксид-Л-эритро-гекс-4-енепиранозилуроната на невосстанавливаемом конце образующихся олигосахари-

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-54-540004.

дов (Preiss, Ashwell, 1962). Эти лиазы классифицированы в три группы на основе их субстратной специфичности: β -L-маннуронат лиазы (EC4.2.2.3), α -L-гулуронат лиазы (EC4.2.2.11) и бифункциональные лиазы. На основании сходства аминокислотных последовательностей альгинат лиазы делятся на семь семейств полисахарид лиаз (PL)₃ (PL 5, 6, 7, 14, 15, 17 и 18) в базе структур Carbohydrate-Active enZymes (CAZy) (Wang et al., 2015; Zhu, Yin, 2015). Альгинат лиазы играют важную роль в жизнедеятельности водорослей (Shiraiwa et al., 1975; Wong et al., 2000) и круговороте углерода в морской среде. Эти ферменты находят широкое применение в фармакологии и биотехнологии (Wong et al., 2000; Alkawash et al., 2006; Kim et al., 2011). Сведения об альгинат лиазах морских бактерий весьма ограничены (Cantarel et al., 2009; Wang et al., 2015). Альгинат лиазы найдены в морских водорослях, моллюсках и микроорганизмах, а также в почвенных бактериях (Wong et al., 2000), в бактериях-патогенах человека и ассоциантах бурых водорослей (Sawabe et al., 1997; Алексеева и др., 2004). Всесторонне охарактеризованы свойства и установлены 3D-структуры альгинат лиаз из морских бактерий *Saccharophagus degradans* 2–40 (Park et al., 2014), *Alteromonas* sp. 272 и *Pseudoalteromonas* sp. SM0524 (Dong et al., 2014), заселяющих морскую траву и бурые водоросли.

Фукоиданазы – ферменты, которые катализируют гидролиз О-гликозидной связи между остатками сульфатированной α -L-фукозы в основной цепи фукоидана. Имеются сведения о фукоиданазах моллюсков (Kitamura et al., 1992; Бурцева и др., 2000a), иглокожих (Sasaki et al., 1996), грибов (Rodríguez-Jasso et al., 2010) и бактерий-эпифитов (Бакунина и др., 2000, 2002; Colin et al., 2006). К настоящему времени охарактеризованы только два фермента, гены которых выделены из геномов морских бактерий рода *Formosa* (Colin et al., 2006; Ермакова и др., 2012; Silchenko et al., 2013).

В связи с этим цель данной работы – поиск новых источников ферментов, катализирующих превращение полианионных олиго- и полисахаридов, среди бактерий-эпифитов бурой водоросли *Sargassum polycystum*, а также характеристика их свойств.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектом исследования служили штаммы морских бактерий, выделенные из водорослей рода *Sargassum*, собранных в 2010 г. во время совместных экспедиций российских и вьетнамских учёных на НИС "Академик Опарин". Штаммы хранятся в коллекции Нячангского института научных и прикладных технологий (НИТРА) Вьетнама. Морские бактерии были выделены из микробного сообщества, выполняющего биodeградацию бурых водорослей рода *Sargassum*. Кусочек водоросли промывали в стерильной морской воде, помещали в ёмкости со стерильной морской водой, содержащей пептон в концентрации 10 г/л, и выдерживали в течение месяца. Образцы воды наносили на плотную питательную среду, содержащую агар и неочищенный фукоидан из водорослей *Sargassum polycystum* и *S. microcystum*. Выросшие колонии отсеивали на

чашки с плотной питательной средой для получения чистых культур бактерий.

В качестве компонентов среды для культивирования бактерий использовали бактопептон разных фирм производителей: Difco (среда 1), Франция ГНЦ ПМ (среда 2) и HiMedia Lab (среда 3), дрожжевой экстракт разных фирм производителей: Франция ГНЦ ПМ (среда 4) и HiMedia Lab (среда 5), а также соли K_2HPO_4 и $MgSO_4 \times 5H_2O$ отечественного производства.

Бактерии выделяли на твердой среде следующего состава (г/л): морская вода – 1000 мл, фукоиданы из водорослей *S. polycystum* и *S. microcystum* – 2, агар – 15; pH – 7.0–7.2. Чистые культуры бактерий получали и хранили на среде следующего состава (г/л): морская вода – 500 мл, дистиллированная вода – 500 мл, дрожжевой экстракт – 1.0, пептон – 1.0, K_2HPO_4 – 0.1, $MgSO_4 \times 5H_2O$ – 0.1, агар – 15; pH – 7.0–7.2. Бактерии идентифицировали согласно стандартным методам (Smibert, Krieg, 1994; Ivanova et al., 2002). Для исследования ферментов бактерии культивировали на жидкой среде, содержащей (г/л) дрожжевой экстракт или бактопептон (2.0), K_2HPO_4 (0.1), $MgSO_4 \times 5H_2O$ (0.1), фукоидан *Sargassum mcclurei* (0.01), а также по 250 мл морской и дистиллированной воды (pH 7.0) на термостатирующей качалке при температуре 27°C в течение 24 и 48 ч.

Для изучения динамики роста бактерий посевной материал наращивали в колбах объёмом 250 см³, содержавших по 100 мл питательной среды, в течение 24 ч при 25°C на качалке со скоростью вращения 150 об/мин до плотности клеточной суспензии, равной 10⁹ кл/мл. Полученный посевной материал инокулировали в колбы объёмом 250 см³, содержавшие 100 мл этой же питательной среды. Культуру выращивали в течение 60 ч на термостатированной качалке при 25°C и 120 об/мин. Рост бактерий регистрировали каждые 5 ч, измеряя мутность жидкой среды при 660 нм на спектрофотометре CE-1011 (CECIL); готовили экстракт из биомассы и определяли в нём активность ферментов и количество белка.

Бактериальные клетки осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 30 мин. Навеску сырой биомассы бактерий ресуспендировали в 0.01 M Na⁺ фосфатном буфере (pH 7.2). Бактериальные клетки разрушали с помощью ультразвукового диспергатора HD2070 (Bandelin Sonopuls), выдерживали в течение 3 ч при 4°C и центрифугировали 30 мин при 12000 g. Супернатант использовали для тестирования активности внутриклеточных ферментов.

В качестве субстратов для тестирования активности ламинариназы и амилазы использовали ламинаран из бурой водоросли *Saccharina cichorioides* и амилопектин (Sigma) соответственно. Для определения активности фукоиданаз использовали фукоиданы из бурых водорослей *S. cichorioides* (сульфатированный 1,3- α -L-фукан), *Fucus evanescens* (1,3;1,4- α -L-фукан, сульфатированный по C2) (Zvyagintseva et al., 2005) и *S. mcclurei* (высокосульфатированный галакто 1,3- α -L-фукан) (Бурцева и др., 2009; Thinh et al., 2013). Для тестирования активности β -D-глюкозидазы, α -D-маннозидазы, β -D- и α -D-галактозидазы, β -N-ацетил-глюкозаминидазы, β -N-ацетил-галактозаминидазы и α -L-фукозидазы использовали коммерческие п-нитрофенил-(п-НФ)-гликозиды (Sigma): п-НФ- β -D-глюко- и п-НФ- α -D-маннопиранозиды, п-НФ- β -D- и п-НФ- α -D-галактопиранозиды, п-НФ-NAc- β -D-глюко- и п-НФ-NAc- β -D-галактозаминиды и п-НФ- α -L-фукопиранозид соответственно. Для детектирования активности альгинат лиазы использовали полиманнуроновую кислоту из бурой водоросли *F. evanescens* (Zvyagintseva et al., 2005).

Для определения активности полисахарид деградирующих ферментов к 50 мкл раствора экстракта добавляли 50 мкл

раствора 0.1 М Na⁺ фосфатного буфера (pH 7.2) и 150 мкл раствора полисахарида в воде. Смесь выдерживали в течение 21 ч при температуре 37°C. За единицу активности принимали количество фермента, при действии которого образуется 1 нмоль восстанавливающих сахаров за 1 мин. Количество восстанавливающих сахаров определяли по методу Нельсона (Nelson, 1944).

При определении активности гликозидаз к 50 мкл раствора бактериального экстракта приливали 100 мкл раствора соответствующего хромогенного гликозида в воде (1 мг/мл). Смесь выдерживали в течение 15 мин при температуре 37°C; реакцию останавливали добавлением раствора 1 М Na₂CO₃. За единицу активности фермента принимали такое его количество в 1 мл раствора, которое катализировало образование 1 нмоля п-нитрофенола в минуту. Удельную активность ферментов рассчитывали как отношение стандартных единиц активности к концентрации белка в реакционной смеси, которую определяли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976).

Частичная очистка полиманнуронат лиазы включала осаждение белков из экстракта сульфатом аммония (80% насыщения), осадок отделяли центрифугированием при 12000 g и растворяли в 0.01 М Na⁺ фосфатном буфере, pH 7.2. Раствор подвергали диализу против воды и хроматографировали на анионообменной колонке 15 Q PE (4.6 100 мм) (Amersham Pharmacia Biotech), уравновешенной 0.01 М Na⁺ фосфатным буфером, pH 7.2. Белок элюировали линейным градиентом концентраций NaCl (0–0.5 М, общий объем – 40 мл) в 0.01 М Na⁺ фосфатном буфере (pH 7.2), со скоростью 0.5 мл/мин. Фракции, содержавшие ферментативную активность, объединяли, концентрировали до 2 мл на мембране для ультрафильтрации PM-30 (Amicon). Полученный препарат фермента использовали для дальнейших исследований.

Для изучения влияния pH на активность альгинат лиазы составляли реакционную смесь, содержащую 50 мкл раствора фермента, 50 мкл 0.1 М Na⁺ цитрат-фосфатного буфера (pH от 4.4 до 8.0) и 150 мкл раствора полиманнурановой кислоты (2 мг/мл), которую инкубировали в течение 5 ч при 37°C. Количество восстанавливающих сахаров определяли, как описано выше.

При изучении температурного оптимума действия альгинат лиазы смесь, содержащую 50 мкл раствора фермента, 50 мкл 0.1 М Na⁺ фосфатного буфера (pH 7.2) и 150 мкл раствора полиманнурановой кислоты (2 мг/мл), выдерживали при температуре от 5 до 75°C (интервал – 5°C) в течение 5 ч и определяли количество образовавшихся восстанавливающих сахаров. Термостабильность частично очищенного препарата альгинат лиазы определяли следующим образом: 50 мкл фермента выдерживали в течение 30 мин при температуре от 5 до 75°C, пробы охлаждали, добавляли 50 мкл 0.1 М Na⁺ фосфатного буфера (pH 7.2) и 150 мкл раствора полиманнурановой кислоты (2 мг/мл), инкубировали в течение 5 ч при 37°C и определяли количество восстанавливающих сахаров.

Статистическую обработку данных проводили при помощи критерия Стьюдента (Excel).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Альгинат лиазы ранее были выделены из бактерий-эпифитов бурых водорослей *Eisenia bicyclis* (Sakami et al., 1994; Sawabe et al., 1997), *Fucus evanescens* (Ivanova et al., 2002; Алексеева и др., 2004) и *Saccharina japonica* (Wang et al., 2006, 2016). В настоящее время имеется одно исследование, посвященное альгинат лиазам из бактерий-

ассоциантов водорослей рода *Sargassum* (Brown, Preston, 1991).

Штаммы F10 и F14, изолированные нами из воды, в которой в течение месяца выдерживали кусочки талломов бурых водорослей *Sargassum microcystum* и *S. polycystum* соответственно, оказались наиболее стабильными и воспроизводимо культивируемыми. Клетки обоих штаммов (табл. 1) представляют собой грамотрицательные, аэробные, подвижные палочки, оксидаза и каталаза положительные. Штамм F14 рос на среде, содержавшей NaCl в концентрации 2–6%, и был способен выделять сероводород. Для него характерна высокая гидролитическая активность в отношении крахмала, желатина, твина 20, твина 40, твина 80 и ДНК. Штамм F10 трансформировал мальтозу, лактозу, рамнозу, глюкозу, сахарозу, галактозу, N-ацетил-D-глюкозамин, ксилозу, рибозу, арабинозу, маннит, целлобиозу и фруктозу до соответствующей кислоты. Штамм F14 не усваивал все перечисленные углеводы. Штаммы F10 и F14 несколько различались по чувствительности к антибиотикам.

Для стандартизации условий культивирования было исследовано влияние добавок дрожжевых экстрактов и пептонов, полученных от разных фирм производителей, на рост и развитие штамма F14, а также на активность фукоиданазы и альгинат лиазы (табл. 2). Поскольку эти ферменты могут иметь как кислые, так и слабощелочные оптимумы действия, активность в экстрактах биомассы тестировали при pH 5.2 и 7.2 в 0.1 М Na⁺-цитрат-фосфатном и 0.1 М Na⁺-фосфатном буферах соответственно. Высокий уровень активности ферментов отмечен при обоих значениях pH, хотя фукоиданаза была более активна при pH 5.2, а полиманнуронат лиаза – при pH 7.2. Широкий диапазон pH характерен для экстрактов, содержащих смеси различных молекулярных форм альгинат лиаз (Алексеева и др., 2004), которые имеют как кислые, так и слабощелочные pH оптимумы действия. Как правило, такая смесь ферментов проявляет синергический эффект, который выражается в их последовательно-параллельном действии на полимерный субстрат (Алексеева и др., 2004). Фукоидан из *S. mcclurei* был наиболее эффективно деструктирован при pH 5.2 под действием экстракта штамма F14, выращенного на среде с пептоном HiMedia Lab (табл. 2).

В экстрактах штаммов F10 и F14 отмечена активность амилазы, 1,3-β-D-глюканазы и β-D-глюкозидазы. Эти ферменты участвуют в разрушении ламинарана и присутствуют в подавляющем большинстве морских бактерий (Бакунина и др., 1996, 2000, 2002, 2012; Ivanova et al., 2002; Алексеева и др., 2004; Урванцева и др., 2006) и грибов (Бурцева и др., 2000б, 2003, 2010; Burtseva et al., 2003). На фукоидан и полиманнурановую кислоту действовал только экстракт штамма F14 (табл. 3). Кроме того, в экстракте штамма F14, культивируемого на среде 4, отмечена активность ряда гликозидаз: β-NAc-D-глюкозаминидазы – наиболее широко распространенного фермента среди морских бактерий (Иванова и др., 1998)

Таблица 1. Фенотипические характеристики штаммов F10 и F14

Характеристика	F10	F14
Тип бактерии (по типу клеточной стенки)	Грамотрицательные	Грамотрицательные
Тип метаболизма	Аэробные	Аэробные
Форма клеток	Палочки	Палочки
Подвижность	+	+
Оксидаза и каталаза	+	+
Диапазон концентраций NaCl (%) для роста	0–10	2–6
Температурный диапазон для роста, °C	8–40	8–45
Диапазон значений pH для роста	4.5–11.5	5–10
Нитратредукция	+	–
Гидролизует крахмал, желатин, ДНК, твин 20, твин 40, твин 80	–	+
Усваивает углеводы с образованием мальтозы, лактозы, рамнозы, глюкозы, сахарозы, галактозы, N-ацетил-β-D-глюкозамина, ксилозы, рибозы, арабинозы, манита, целлобиозы, фруктозы	+	–
Усваивает углеводы с образованием мелибиозы, глицерина, раффинозы, маннозы	–	–
Способность выделять сероводород	–	+
Восприимчивость к антибиотикам	Канамицину, рифампицину, левомецетину, налидиксовой кислоте, стрептомицину, гентамицину, офлоксацину, полимиксину, неомицину, цефазолину, цефаликсину	Канамицину, рифампицину, левомецетину, налидиксовой кислоте, стрептомицину, гентамицину, офлоксацину, полимиксину, неомицину, карбенициллину, эритромицину, ампицилину, олеандомицину, тетрациклину

и грибов (Бурцева и др., 2000б; Burtseva et al., 2003), реже встречающихся β-D- и α-D-галактозидазы (Иванова и др., 1998; Бурцева и др., 2000б; Burtseva et al., 2003; Бакунина и др., 2012), а также α-D-маннозидазы – относительно редкого фермента среди ассоциантов водорослей (Бурцева и др., 2000б; Burtseva et al., 2003; Урванцева и др., 2006; Бакунина и др., 2012). В то же время отсутствовала активность β-NAc-D-галактозаминидазы и α-L-фукозидазы, крайне редко встречающихся у морских микроорганизмов (Бакунина и др., 2002, 2012; Ivanova et al., 2003) (табл. 3).

Исследование влияние добавок на рост и развитие штамма F14 показало, что дрожжевой экстракт (Фран-

ция ГНЦ ПМ) продлевал стационарную фазу от 15 до 60 ч (рис. 1б) и стимулировал увеличение уровня активности альгинат лиазы (рис. 1в). Фермент появлялся на предстационарной фазе роста бактерии и сохранялся в течение всей её жизни, как показано в предшествующих работах для альгинат лиаз из *Sargassum fluitans* и *Pseudoalteromonas citrea* (Brown, Preston, 1991; Алексеева и др., 2004). На среде, содержащей только бактопептон (Difco), гибель клеток начиналась через 30 ч (рис. 1б). Однако практически в 2 раза увеличивалась фукоиданазная активность (рис. 1д). Таким образом, дрожжевой экстракт от фирмы производителя «Франция ГНЦ ПМ» оказался наиболее подходящим для использования

Таблица 2. Влияние компонентов питательной среды на активность фукоиданаз и альгинат лиаз штамма F14 при разном буфере*

Субстрат**	Удельная активность ферментов, нмоль/мин/мг белка					
	Фукоидан из <i>Sargassum mcclurei</i>		Фукоидан из <i>Fucus evanescens</i>		Полиманнуоновая кислота из <i>Fucus evanescens</i>	
	pH 5.2	pH 7.2	pH 5.2	pH 7.2	pH 5.2	pH 7.2
Среда 1	0.65±0.33	0.55±0.12	2.98±1.01	0.69±0.16	1.02±0.86	2.95±0.27
Среда 2	0.36±0.36	0.02±0.02	0.67±0.32	0.59±0.38	2.23±0.50	1.53±0.36
Среда 3	3.70±0.46	0.14±0.03	0.69±0.32	0	5.42±4.32	0
Среда 4	1.18±1.18	0.09±0.09	4.47±3.12	2.34±0.57	1.55±0.49	3.24±0.46
Среда 5	0.18±0.07	0.11±0.03	0.51±0.08	0.02±0.02	2.56±0.31	1.31±0.41

*0.1 М цитрат-фосфатный буфер (pH 5.2) и 0.1 М фосфатный буфер (pH 7.2), время культивирования 24 ч.

**Среда 1 – бактопептон (Difco), среда 2 – пептон (Франция ГНЦ), среда 3 – пептон (HiMedia Lab), среда 4 – дрожжевой экстракт (Франция ГНЦ), среда 5 – дрожжевой экстракт (HiMedia Lab).

Таблица 3. Содержание ферментов штаммов F10 и F14

Фермент	Субстрат	Время культивирования/удельная активность ферментов, нмоль/мин/мг		
		F10	F14	
		24 ч	24 ч	48 ч
1,3-β-D-Глюканаза	Ламиранан	0.42±0.02	3.55±0.35	0.82±0.08
α-амилаза	Амилпектин	2.62±0.11	0.26±0.03	0.10±0.01
Полиманнуронат лиаза	Полиманнуоновая кислота из <i>Fucus evanescens</i>	0	0.19±0.04	0.23±0.04
α-L-Фукоиданаза	Фукоидан из <i>Sargassum cichorioides</i>	0	0.70±0.02	0.08±0.05
α-L-Фукоиданаза	Фукоидан из <i>Fucus evanescens</i>	0	0.47±0.05	0.10±0.07
α-D-Галактозидаза	pNp-α-D-галактопиранозид	0	46.41±2.32	35.07±1.75
β-D-Галактозидаза	pNp-β-D-галактопиранозид	0	9.67±0.05	4.31±0.22
β-Глюкозидаза	pNp-β-D-глюкопиранозид	1.41±0.10	8.90±0.44	7.06±0.35
β-NAc-D-Глюкозаминидаза	pNp-N-ацетил-β-D-глюкозаминид	0	0.49±0.02	0.50±0.03
β-NAc-D-Галактозаминидаза	pNp-N-ацетил-β-D-галактозаминид	0	0	0
α-D-Маннозидаза	pNp-α-D-маннопиранозид	0	0.18±0.01	0.13±0.01
α-L-Фукозидаза	pNp-α-L-фукопиранозид	0	0	0

в качестве добавки при получении альгинат лиазы, а бактопептон (Difco) – при получении фукоиданазы.

Частично очищенная полиманнуронат лиаза штамма F14 сохраняла активность в широком диапазоне значений pH (5.0–8.0), максимальная активность отмечена

при pH 6.0 (рис. 2А). Перегиб линии в районе pH 7.0 на графике зависимости активности полиманнуронат лиазы от pH и широкий интервал значений pH, вероятно, свидетельствуют о наличии нескольких молекулярных форм фермента в препарате. Две молекулярные формы

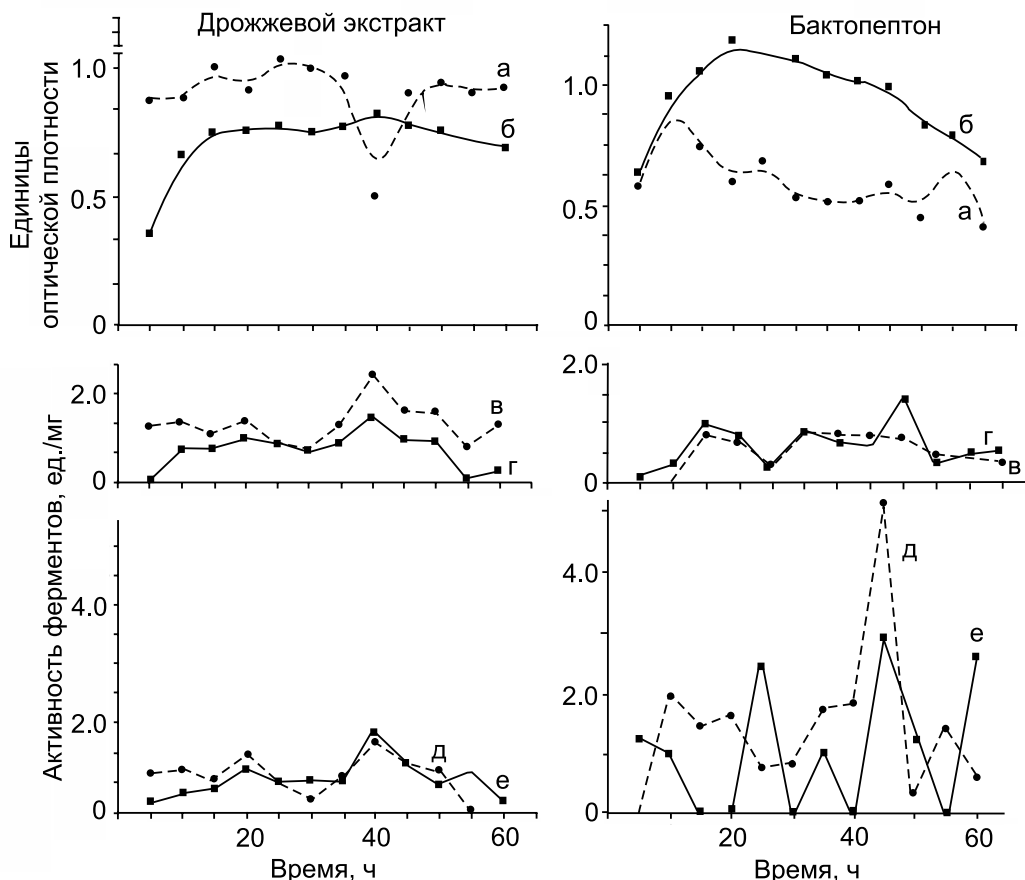


Рис. 1. Динамика роста бактерии F14 на среде с дрожжевым экстрактом и бактопептоном: а – накопление белка при 595 нм; б – накопление биомассы при 660 нм; в – ктивность полиманнуронат лиазы при pH 7.2; г – активность полиманнуронат лиазы при pH 5.2; д – активность фукоиданазы при pH 7.2; е – активность фукоиданазы при pH 5.2.

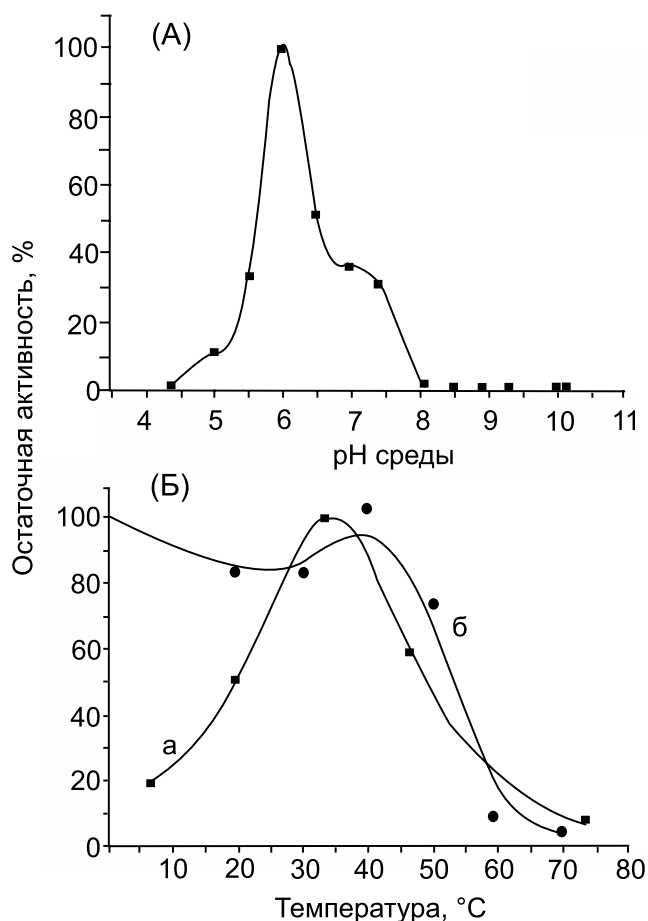


Рис. 2. Зависимость активности полиманнуронат лиазы от pH (А) и температуры (Б). а – Т-оптимум, б – Т-стабильность.

альгинат лиазы с разной субстратной специфичностью, активные в диапазоне нейтральных значений pH, синтезирует бактерия-ассоциант бурой водоросли *Sargassum fluitans* (Brown, Preston, 1991). Подобные зависимости были показаны для предварительно очищенных альгинат лиаз из морских бактериальных эпифитов бурой водоросли *S. japonica* (Wang et al., 2006; Chen et al., 2016; Wang et al., 2016).

Полиманнуронат лиаза штамма F14 проявляла мезофильные свойства. Её активность достигала максимального значения при температуре 35°C (рис. 2а) и сохранялась на уровне 100% при прогревании фермента до 40°C (рис. 2б). Полная температурная инактивация полиманнуронат лиазы наблюдалась при 60°C. В морских бактериальных эпифитах бурых водорослей встречаются альгинат лиазы как мезофилы (Алексеева и др., 2004; Han et al., 2004), так и психрофилы (Wang et al., 2006; Chen et al., 2016). Последние проявляют активность при 5°C, но полностью инактивируются при 30–35°C. Сведения о биохимических свойствах термофильных альгинат лиаз из морских бактериальных эпифитов бурых водорослей в литературе отсутствуют (Wang et al., 2015). Однако недавно из прибрежных отложений был выделен термофильный штамм Alg1 новой бактерии *Defluviitalea*

pharphyphila, эффективно деградирующий альгинат при температуре 65°C (Ji et al., 2016). В геноме этого штамма обнаружено, по крайней мере, шесть генов предполагаемых альгинат лиаз.

При действии частично очищенного препарата фермента на полиманнуроновую кислоту из *F. evanescens* наблюдалось увеличение оптической плотности реакционной смеси при 235 нм, характерное для появления ненасыщенных олигосахаридов в продуктах реакции. Это служит доказательством того, что деградация полиманнуроновой кислоты происходит по механизму β-элиминирования (Gacesa, 1992), а исследуемый фермент действительно является альгинат лиазой.

Таким образом, из талломов бурых водорослей *S. polycystum* и *S. microcystum*, собранных в Тайском море у берегов Социалистической Республики Вьетнам, были выделены два устойчивых бактериальных штамма, которые значительно различаются по морфологическим характеристикам и составу действующих О-гликозид-гидролаз. Штамм F14 из *S. polycystum* характеризуется присутствием активных 1,3-β-D-глюканазы, β-D-глюкозидазы и β-D-галактозидазы, а также высокоактивной α-D-галактозидазы. Под действием экстракта этой бактерии разрушались фукоидан и полиманнуроновая кислота. Различие метаболических профилей позволило предположить, что штаммы F10 и F14 выполняют разные функции в микробных сообществах, связанные с разрушением клеточных стенок водорослей. Штамм F14 можно рассматривать как перспективный источник альгинат лиаз и фукоиданаз для дальнейшего изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алексеева С.А., Бакунина И.Ю., Недашковская О.И. и др. Внутриклеточные альгинолитические ферменты морской бактерии *Pseudoalteromonas citrea* КММ 3297 // Биохимия. 2004. Т. 64, № 3. С. 328–337.
- Бакунина И.Ю., Иванова Е.П., Недашковская О.И. и др. Поиск продуцентов α-галактозидаз среди морских бактерий рода *Alteromonas* // Прикл. биохим. и микробиол. 1996. Т. 32, № 6. С. 624–628.
- Бакунина И.Ю., Недашковская О.И., Алексеева С.А. и др. Особенности деградации фукоидана морскими протеобактериями *Pseudoalteromonas citrea* // Микробиология. 2002. Т. 71, № 1. С. 49–55.
- Бакунина И.Ю., Недашковская О.И., Ким С.Б. и др. Разнообразие гликозидазных активностей бактерий филума *Bacteroidetes*, изолированных из морских водорослей // Микробиология. 2012. Т. 81, № 6. С. 745–753.
- Бакунина И.Ю., Шевченко Л.С., Недашковская О.И. и др. Поиск фукоидан-гидролаз среди морских микроорганизмов // Микробиология. 2000. Т. 69, № 3. С. 370–376.
- Бурцева Ю.В., Веригина Н.С., Сова В.В. и др. О-гликозилгидролазы морских мицелиальных грибов. β-1,3-Глюканазы морского гриба *Trichoderma aureoviride* // Прикл. биохим. и микробиол. 2003. Т. 39, № 5. С. 542–548.
- Бурцева Ю.В., Кусайкин М.И., Сова В.В. и др. Распространение фукоиданаз и некоторых гликозидаз среди морских безпозвоночных // Биол. моря. 2000а. Т. 26, № 6. С. 429–432.

- Бурцева Ю.В., Сова В.В., Пивкин М.В. и др. Ферменты углеводного обмена мицелиальных грибов, обитающих в морской среде. β -1,3-Глюканаза морского гриба *Chaetomium indicum* // Биохимия. 2000б. Т. 65, № 10. С. 1175–1183.
- Бурцева Ю.В., Сова В.В., Пивкин М.В. и др. Распространение О-гликозилгидролаз в морских грибах Японского и Охотского морей: характеристика внеклеточной N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы морского гриба *Penicillium canescens* // Прикл. биохим. и микробиол. 2010. Т. 46, № 5. С. 700–708.
- Бурцева Ю.В., Шевченко Н.М., Звягинцева Т.Н. и др. Полисахариды бурых водорослей (*Sargassum*) Южно-Китайского моря // Морские прибрежные экосистемы. Водоросли, беспозвоночные и продукты их переработки: Третья международ. науч.-практ. конф. Владивосток: ТИПРО-Центр. 2009. С. 171–176.
- Ермакова С.П., Бакунина И.Ю., Иванова Е.Е. и др. Влияние метаболитов бурых водорослей на биосинтез гликозилгидролаз бактериями, деградирующими таллом бурых водорослей *Fucus evanescens* // Микробиология. 2012. Т. 81, № 3. С. 396–402.
- Иванова Е.П., Бакунина И.Ю., Недашковская О.И. и др. Распространение морских микроорганизмов, продуцирующих β -N-ацетилглюкозаминидазы, α -галактозидазы, α -N-ацетилгалактозаминидазы // Биол. моря. 1998. Т. 24, № 6. С. 351–358.
- Урванцева А.М., Бакунина И.Ю., Недашковская О.И. и др. Распространение внутриклеточных фукоидангидролаз среди морских бактерий семейства *Flavobacteriaceae* // Прикл. биохим. и микробиол. 2006. Т. 42, № 5. С. 552–559.
- Alkawash M.A., Soothill J.S., Schiller N.L. Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms // Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 2006. Vol. 114, no. 2. P. 131–138.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72, no. 1–2. P. 248–254.
- Brown B.J., Preston J.F. L-Guluronan-specific alginate lyase from a marine bacterium associated with *Sargassum* // Carbohydr. Res. 1991. Vol. 211. P. 91–102.
- Burtseva Yu.V., Verigina N.S., Sova V.V. et al. Filamentous marine fungi as producers of O-glycosylhydrolases: β -1,3-glucanase from *Chaetomium indicum* // Mar. Biotechnol. 2003. Vol. 5, no. 4. P. 349–359.
- Cantarel B.L., Coutinho P.M., Rancurel C. et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics // Nucleic Acids Res. 2009. Vol. 37. P. 233–238.
- Chen X.-L., Dong S., Xu F. et al. Characterization of a new cold-adapted and salt-activated polysaccharide lyase family 7 alginate lyase from *Pseudoalteromonas* sp. SM0524 // Front. Microbiol. 2016. Vol. 7. doi:10.3389/fmicb.2016.01120
- Colin S., Deniaud E., Jam M. et al. Cloning and biochemical characterization of the fucanase FcnA: definition of a novel glycoside hydrolase family specific for sulfated fucans // Glycobiology. 2006. Vol. 16, no. 11. P. 1021–1032.
- Dong S., Wei T.D., Chen X.L. et al. Molecular insight into the role of the N-terminal extension in the maturation, substrate recognition, and catalysis of a bacterial alginate lyase from polysaccharide lyase family 18 // J. Biol. Chem. 2014. Vol. 289, no. 43. P. 29558–29569.
- Fenoradoso T.A., Ali G., Delattre C. et al. Extraction and characterization of an alginate from the brown seaweed *Sargassum turbinarioides* Grunow // J. Appl. Phycol. 2010. Vol. 22, no. 2. P. 131–137.
- Gacesa P. Enzymic degradation of alginates // Int. J. Biochem. 1992. Vol. 24, no. 4. P. 545–552.
- Han F., Gong Q.-H., Song K. et al. Cloning, sequence analysis and expression of gene *alyVI* encoding alginate lyase from marine bacterium *Vibrio* sp. QY101 // DNA Seq. 2004. Vol. 15, no. 5–6. P. 344–350.
- Huynh Q.N., Nguyen H.D. The seaweed resources of Vietnam // Seaweed resources of the world / Eds. Critchley A.T., Ohno M. Yokosuka, Japan. Kanagawa International Fisheries Training Center, Japan International Cooperative Agency. 1998. P. 62–69.
- Itoh H., Noda H., Amano H. et al. Antitumor activity and immunological properties of marine algal polysaccharides, especially fucoidan, prepared from *Sargassum thunbergii* of Phaeophyceae // Anticancer Res. 1993. Vol. 13, no. 6. P. 2045–2052.
- Ivanova E.P., Bakunina I. Yu., Nedashkovskaya O.I. et al. Ecophysiological variabilities in ectohydrolytic enzyme activities of some *Pseudoalteromonas* species, *P. citrea*, *P. issachenkonii*, and *P. nigrifaciens* // Curr. Microbiol. 2003. Vol. 45, no. 1. P. 6–10.
- Ivanova E.P., Bakunina I. Yu., Sawabe T. et al. Two species of culturable bacteria associated with degradation of brown algae *Fucus evanescens* // Microb. Ecol. 2002. Vol. 43, no. 2. P. 242–249.
- Ji S.-Q., Wang B., Lu M. et al. *Deffluviitalea phaphyphila* sp. nov., a novel thermophilic bacterium that degrades brown algae // Appl. Environ. Microbiol. 2016. Vol. 82, no. 3. P. 868–877.
- Josephine A., Amudha G., Veena C.K. et al. Beneficial effects of sulfated polysaccharides from *Sargassum wightii* against mitochondrial alterations induced by Cyclosporine A in rat kidney // Mol. Nutr. Food Res. 2007. Vol. 51, no. 11. P. 1413–1422.
- Kim H.S., Lee C.-G., Lee E.Y. Alginate lyase: structure, property, and application // Biotechnol. Bioprocess Eng. 2011. Vol. 16, no. 5. P. 843–851.
- Kitamura K., Matsuo M., Yasui T. Enzymic degradation of fucoidan by fucoidanase from the hepatopancreas of *Patinopecten yessoensis* // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1992. Vol. 56. P. 490–494.
- Kusaykin M.I., Bakunina I. Yu., Sova V.V. et al. Structure, biological activity, and enzymatic transformation of fucoidans from the brown seaweeds // Biotechnol. J. 2008. Vol. 3, no. 7. P. 904–915.
- Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose // J. Biol. Chem. 1944. Vol. 153, no. 1. P. 375–381.
- Nguyen Huu Dai. Rong Mo (Sargassaceae) Viet Nam. Hochiminh City: Agriculture Publishing House. 1997. 200 p.
- Park D., Jagtap S., Nair S.K. Structure of a PL17 family alginate lyase demonstrates functional similarities among exotype depolymerases // J. Biol. Chem. 2014. Vol. 289, no. 12. P. 8645–8655.
- Preiss J., Ashwell G. Alginic acid metabolism in bacteria: I. Enzymatic formation of unsaturated oligosaccharides and 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid // J. Biol. Chem. 1962. Vol. 237, no. 2. P. 309–316.
- Rodríguez-Jasso R.M., Mussatto S.I., Pastrana L. et al. Fucoidan-degrading fungal strains: screening, morphometric evaluation, and influence of medium composition // Appl. Biochem. Biotechnol. 2010. Vol. 162, no. 8. P. 2177–2188.
- Sakami T., Sugiyama M., Kurata K. Growth-stimulating effects of algal excreted substances on bacteria isolated from algal blade surface of the brown alga *Eisenia bicyclis* // Nippon Suisan Gakk. 1994. Vol. 60, no. 6. P. 749–753.
- Sasaki K., Sakai T., Kojima K. et al. Partial purification and characterization of an enzyme releasing 2-sulfo-L-fucopyranosyl (12) pyridylaminated fucose from a sea urchin, *Strongylocentrotus*

- nudus* // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1996. Vol. 60, no. 4. P. 666–668.
- Sawabe T., Ohtsuka M., Ezura Y. Novel alginate lyases from marine bacterium *Alteromonas* sp. strain H-4 // Carbohydr. Res. 1997. Vol. 304, no. 1. P. 69–76.
- Shiraiwa Y., Abe K., Sasaki S. et al. Alginate lyase activities in the extracts from several brown algae // Bot. Mar. 1975. Vol. 18, no. 2. P. 97–104.
- Silchenko A.S., Kusaykin M.I., Kurilenko V.V. et al. Hydrolysis of fucoidan by fucoidanase isolated from the marine bacterium, *Formosa algae* // Mar. Drugs. 2013. Vol. 11, no. 7. P. 2413–2430.
- Smibert R.M., Krieg N.R. Phenotypic characterization // Methods for general and molecular bacteriology. Washington: ASM. 1994. P. 611–651.
- Thinh P.D., Menshova R.V., Ermakova S.P. et al. Structural characteristics and anticancer activity of fucoidan from the brown alga *Sargassum meckurei* // Mar. Drugs. 2013. Vol. 11. P. 1456–1476.
- Wang B., Ji S.-Q., Lu M. et al. Biochemical and structural characterization of alginate lyases: an update // Curr. Biotechnol. 2015. Vol. 4, no. 3. P. 223–239.
- Wang M., Chen L., Liu Z. et al. Isolation of a novel alginate lyase-producing *Bacillus litoralis* strain and its potential to ferment *Sargassum horneri* for biofertilizer // MicrobiologyOpen. 2016. Vol. 5. P. 1038–1049.
- Wang Y.-H., Yu G.-L., Wang X.-M. et al. Purification and characterization of alginate lyase from marine *Vibrio* sp. YWA // Acta Biochim. Biophys. Sin. 2006. Vol. 38, no. 9. P. 633–638.
- Wong T.Y., Preston L.A., Schiller N.L. Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications // Annu. Rev. Microbiol. 2000. Vol. 54. P. 289–340.
- Yabur R., Bashan Y., Hernandez-Carmona G. Alginate from the macroalgae *Sargassum sinicola* as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion // J. Appl. Phycol. 2007. Vol. 19, no. 1. P. 43–53.
- Zhu B., Yin H. Alginate lyase: review of major sources and classification, properties, structure-function analysis and applications // Bioengineered. 2015. Vol. 6, no. 3. P. 125–131.
- Zhu W., Chiu L.C.M., Ooi V.E.C. et al. Antiviral property and mode of action of a sulphated polysaccharide from *Sargassum patens* against herpes simplex virus type 2 // Int. J. Antimicrob. Agents. 2004. Vol. 24, no. 3. P. 279–283.
- Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Nazarenko E.L. et al. Water-soluble polysaccharides of some brown algae of the Russian Far-East. Structure and biological action of low-molecular mass polyuronans // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2005. Vol. 320, no. 2. P. 123–131.

ГРИБЫ В ДОННЫХ ГРУНТАХ БАРЕНЦЕВА И КАРСКОГО МОРЕЙ*

© 2017 Е. Н. Бубнова, Д. А. Никитин

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва 119234

e-mail: katya.bubnova@wsbs-msu.ru

Статья принята к печати 26.01.2017 г.

Исследована микобиота донных осадков на глубине 128–472 м в удалённых от берега районах Баренцева и Карского морей. Видовой состав и численность колониеобразующих единиц (КОЕ) грибов определены в пяти образцах из Карского моря и в 14 образцах из Баренцева моря. В 12 образцах из Баренцева моря впервые для арктических морей определена биомасса грибов. Установлено, что в грунтах обоих морей численность грибов не превышала 13 КОЕ на 1 г сухого субстрата. Всего из образцов было выделено 58 колоний мицелиальных грибов, относящихся к 22 морфотипам, восемь из которых были стерильными; на 1 г субстрата приходилось не более шести морфотипов. Чаще всего это были представители рода *Cladosporium* и стерильные изоляты. При исследовании биомассы показано, что в изученных грунтах присутствовали как споры, так и мицелий грибов. Их общая биомасса была низкой и составляла от 0.1 до 0.620 мг/г субстрата. Абсолютно (от 88 до 99.7%) преобладали мелкие споры диаметром до 3 мкм.

Ключевые слова: морские грибы, донные грунты, разнообразие, биомасса, Арктика, Баренцево море, Карское море.

Fungi in bottom sediments of the Barents and Kara Sea. E. N. Bubnova, D. A. Nikitin (M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119234)

Mycobiota of bottom sediments was investigated at depths of 128–472 m in the Barents and Kara Sea areas remote from shores. The species composition and fungal quantity – the number of fungal colony-forming units (CFU) – were determined in five samples from the Kara Sea and in 14 samples of the Barents Sea. For the first time for the Arctic seas, the fungal biomass was specified in 12 samples of the bottom sediments from the Barents Sea. It was found that fungal quantity in the bottom sediments of the both seas did not exceed 13 CFU per 1 gram of dry substrate. In total, only 58 colonies of filamentous fungi belonging to 22 morphotypes, 8 of which were sterile, were isolated from all the samples. No more than six morphotypes were contained in 1 g of dried substrate; they were mostly species of the genus *Cladosporium* and sterile isolates. The study of the fungal biomass detected both spores and fungal mycelium in the bottom sediments. The total biomass was extremely low and ranged from 0.1 to 0.620 mg/g of the studied substrate. Small spores (diameter less than 3 µm) absolutely predominated (from 88 to 99.7% of the biomass). (Biologiya Morya, 2017, vol. 43, no. 5, pp. 366–371).

Keywords: marine fungi, bottom sediments, diversity, biomass, Arctic, Barents sea, Kara sea.

Традиционно микобиоту морских грунтов изучают с помощью культуральных методов (Kohlmeier, Kohlmeier, 1979; Артемчук, 1981). При их использовании грибы выделяют из осадков от приморских маршей (Артемчук, 1981; Согонов, Марфенина, 1999) до глубин более 4000 м (Damare et al., 2006), от морей приэкваториальных районов (Damare et al., 2006; Samuel et al., 2011) до умеренных (Khudyakova et al., 2000; Пивкин и др., 2005; Бубнова, 2014), субарктических (Согонов, Марфенина, 1999; Бубнова, 2009) и арктических (Артемчук, 1981; Бубнова, 2010) широт. Общей тенденцией современных исследований разнообразия микобиоты в разных морских экотопах является дополнение культуральных методов молекулярными. Чаще всего это молекулярная идентификация выделенных культур, реже используются другие подходы. В частности, методами метагеномики было показано присутствие грибов в различных донных осадках, в том числе глубоководных (Nagano, Nagahama,

2012). Прямая микроскопия очень редко используется при изучении морских грунтов. Известно всего две работы, одна из них посвящена исследованию микобиоты приморских маршей Белого моря (Согонов, Марфенина, 1999), а другая – грибов в глубоководных осадках центральной части Индийского океана (Damare et al., 2006). В обеих статьях отмечено присутствие грибного мицелия, но численные значения биомассы грибов приведены только в первой работе.

В целом, несмотря на развитие морской микологии и рост интереса к исследованиям Арктики, сведений о грибах арктических морей до сих пор крайне мало. Так, Артемчук (1981) приводит информацию лишь о родовом составе грибов, выделенных с литорали губы Дальнезеленца Баренцева моря. По микромицетам в арктических донных осадках опубликована одна работа, посвященная разнообразию микобиоты в некоторых районах западной и центральной частей Карского моря (Bubnova, 2010).

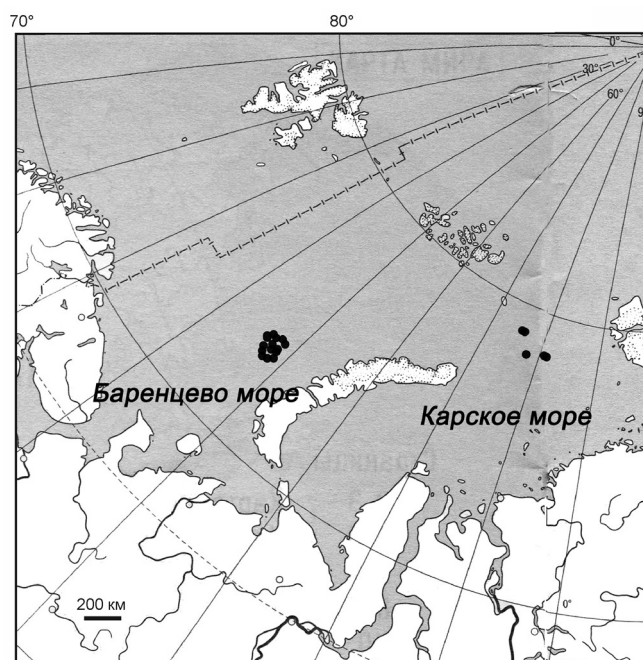
*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 15-04-02722а (организация сбора и хранения материалов, первичная обработка, учёт биомассы) и РНФ № 14-50-00029 (выделение и идентификация культур).

Задача настоящей статьи – исследование культуральными и прямыми микроскопическими методами мицелиальных грибов донных осадков в удалённых от материка районах Северного Ледовитого океана.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для исследования послужили образцы донных грунтов, собранные в 2014 г.: в конце августа в Карском море и в начале октября в Баренцевом море (табл. 1). В Карском море образцы отбирали в северо-восточной части на удалении 350–400 км от берега, в Баренцевом море – в северной части на удалении 220–300 км от берега (см. рисунок). По комплексу условий (постоянная температура около 0°C, океаническая солёность, высокое заиливание, большие глубины, удалённость от берега) данные районы Баренцева и Карского морей сходны между собой. Всего было выполнено 14 станций в Баренцевом море и 5 станций в Карском море; на борт судна грунт поднимали с помощью дночерпателя. Из грунта с помощью срезанного шприца отбирали 2–3 пробы по 1 см³ на расстоянии 10–15 см; материал с образцами высушивали и обрабатывали в течение 45 сут. Общая масса сухого материала составляла 1.0–2.4 г на образец.

Для посевов использовали 1 г сухого образца. Навеску образца смешивали со стерильной водой, доводя общий объём до 10 мл. По 1 мл полученной суспензии помещали на поверхность среды в чашке Петри и разравнивали шпателем. На каждый вариант использовали по 10 чашек со средой (сусло 0.03% общего сахара, морская соль 34%, антибиотик амикацин 500 мг/0.5 л среды). Чашки с посевами инкубировали в течение 2 мес. при температуре 4°C, после этого из образовавшихся колоний выделяли чистые культуры. Грибы идентифицировали в чистых культурах по морфолого-культуральным признакам с использованием соответствующих определителей и статей



Расположение районов отбора образцов донных грунтов для изучения микобиоты в Баренцевом и Карском морях.

(Raper, Thom, 1949; Пидопличко, 1972; Domsch et al., 2007; Zalar et al., 2007; Woudenberg et al., 2013). Синонимии проверяли по базе Indexfungorum (www.indexfungorum.org). Для оценки численности использовали понятие «колониобразующие единицы» (КОЕ); указывали численность образовавшихся колоний на 1 г сухого грунта.

Структуру грибной биомассы определяли методом люминесцентной микроскопии. Длину грибных гиф и объём спор измеряли согласно Блему (Bloem et al., 1995). Численность

Таблица 1. Характеристики отобранных образцов

Номер станции	Дата отбора	Глубина, м	Тип грунта
Карское море			
КМ-01	25.08.2014	193	Ил
КМ-02	25.08.2014	193	—"
КМ-03	26.08.2014	128	—"
КМ-04	27.08.2014	472	Ил, глина
КМ-05	27.08.2014	472	—"
Баренцево море			
БМ-01	05.10.2014	259	Ил, песок
БМ-02*	06.10.2014	180	—"
БМ-03*	06.10.2014	265	—"
БМ-04*	06.10.2014	259	—"
БМ-05*	06.10.2014	269	—"
БМ-06*	08.10.2014	241	—"
БМ-07*	08.10.2014	218	—"
БМ-08*	09.10.2014	203	—"
БМ-09*	09.10.2014	308	—"
БМ-10*	09.10.2014	304	—"
БМ-11*	09.10.2014	297	—"
БМ-12*	09.10.2014	276	—"
БМ-13*	08.10.2014	242	—"
БМ-14	08.10.2014	308	—"

*Образцы, для которых была рассчитана биомасса.

грибных propagул регистрировали по свечению в препаратах калькофлуора белого, связанного с хитином клеточных стенок грибов (Полянская, Звягинцев, 2003), на люминесцентном микроскопе Zeiss Axioskop 2plus (Германия). Пересчёт численности спор и длины мицелия на содержание грибной биомассы (мг сухой биомассы/г абсолютно сухого грунта) проводили с учётом того, что плотность спор составляет 0.837 г/см³, а мицелия – 0.628 г/см³ (Полянская и др., 1995).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Численность и разнообразие грибов

Из образцов было выделено 58 колоний мицелиальных грибов, в том числе 24 колонии из образцов Карского моря и 34 – из образцов Баренцева моря (табл. 2). На 1 г сухого материала приходилось от 1 до 13 колоний из образцов Карского моря и от 0 до 5 колоний – из образцов Баренцева моря. В образцах из Баренцева моря не обнаружено связи численности выделенных грибов с положением точек отбора проб и с глубиной их отбора. В Карском море больше всего грибов обнаружено на относительно мелководной станции, расположенной на глубине 128 м (13 колоний), а меньше всего – на наиболее глубоководной станции (1 колония, глубина 472 м). В среднем из образцов Карского моря выделено несколько больше гри-

бов, хотя различие в численности нельзя считать принципиальным: во всех случаях это в основном единицы, в двух образцах – десятки колоний на 1 г субстрата.

Установленные нами значения чрезвычайно низки, поскольку в большинстве исследованных ранее морских грунтов численность грибов составляла десятки-сотни КОЕ на 1 г (или 1 см³) субстрата: в донных грунтах субарктического Белого моря (Бубнова, 2009), некоторых акваторий Японского и Охотского морей (Khudyakova et al., 2000; Пивкин и др., 2005) и Чёрного моря (Бубнова, 2014), а также прибрежных вод Индийского океана (Samuel et al., 2011). Кроме того, полученные нами значения численности грибов на 2–4 порядка ниже, чем известно для почв граничащей с арктическими морями тундровой зоны (Кирцидели, Томилин, 1997; Кирцидели, 1999). Подобные крайне низкие значения биомассы грибов ранее были показаны только для глубоководных осадков центральной части Индийского океана (Damare et al., 2006), а также для грунтов удалённых от материка относительно глубоких участков Карского моря (Bubnova, 2010). В данной работе было отмечено, что в удалённых от материка районах Карского моря численность грибов ниже, чем в прибрежных и особенно в приэстуарных водах. В нашем случае низ-

Таблица 2. Видовой состав и численность микобиоты исследованных грунтов

Морфотип	Баренцево море		Карское море		Всего	
	ОБ	К	ОБ	К	ОБ	К
Zygomycota						
<i>Umbelopsis isabellina</i> (Oudem.) W. Gams 2003	0	0	1	1	1	1
Ascomycota						
<i>Acremonium murorum</i> (Corda) W. Gams 1971	1	1	0	0	1	1
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl. 1912	1	1	0	0	1	1
<i>Aspergillus flavus</i> Link 1809	0	0	1	1	1	1
<i>Cadophora fastigiata</i> Lagerb. et Melin 1927	1	1	0	0	1	1
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries 1952	4	7	4	7	8	14
<i>Cladosporium</i> cf. <i>fusiforme</i> Zalar, de Hoog et Gunde-Cim. 2007	2	3	0	0	2	3
<i>Cladosporium</i> cf. <i>psychrotolerans</i> Zalar, De Hoog et Gunde-Cim. 2007	2	3	1	3	3	6
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penzig 1882	4	6	0	0	4	6
<i>Penicillium madriti</i> G. Sm. 1961	1	2	0	0	1	2
<i>Penicillium megasporum</i> Orpurt et Fennell 1955	0	0	1	1	1	1
<i>Sarocladium strictum</i> (W. Gams) Summerb. 2011	2	4	0	0	2	4
<i>Scopulariopsis brumptii</i> Salv.-Duval 1935	0	0	1	1	1	1
<i>Ulocladium chartarum</i> (Preuss) E.G. Simmons 1967	2	2	1	1	3	3
Неспороносящие культуры						
Стерильный тип 1	0	0	1	1	1	1
Стерильный тип 2	0	0	1	1	1	1
Стерильный тип 3	0	0	1	2	1	2
Стерильный тип 4.1	2	2	0	0	2	2
Стерильный тип 4.2	0	0	1	4	1	4
Стерильный тип 5	1	1	0	0	1	1
Стерильный тип 6	1	1	0	0	1	1
Стерильный тип 7	0	0	1	1	1	1
Всего	12	34	5	24	17	58

Примечание. ОБ – число образцов, в которых данный морфотип был обнаружен; К – общее число колоний данного морфотипа. Указана общая численность колоний грибов, выделенная из всех образцов (масса каждого образца – 1 г сух. массы).

кая численность грибов, по-видимому, связана с большим расстоянием от материка и с незначительным поступлением грибных пропагул с терригенными стоками, а также с экстремальной суровостью условий в исследованных экотопах. Хотя это и не являлось целью настоящей работы, заметим, что численность дрожжей в исследованных осадках была незначительной: всего выделено 36 колоний, из них 31 колония выделена из грунтов Баренцева моря. Однако относительная численность дрожжевых грибов в исследованных грунтах была высокой; в большинстве образцов из Баренцева моря они составляли почти половину всех выделенных колоний, а в некоторых образцах даже преобладали. Ранее в морских грунтах не было отмечено такое высокое относительное обилие дрожжей. Вероятно, в данном случае это можно объяснить особой экстремальностью условий, если рассматривать дрожжевые формы как одну из возможных адаптаций к условиям постоянного холода, низкого содержания кислорода, высокой солёности и повышенного гидростатического давления (Robinson, 2001).

При невысокой численности видовой состав обнаруженных грибов был довольно разнообразным. Все выделенные культуры мы отнесли к 22 морфотипам: 8 были стерильными, а 14 имели спороношения. Всего были обнаружены представители 10 родов: один вид из отдела Zygomycota (*Umbelopsis isabellina*) и девять родов с 13 видами – анаморфы аскомицетов. На 1 г исследованного грунта приходилось от 0 до шести морфотипов, но в основном – 1–2. Самым разнообразным был род *Cladosporium* Link, к которому относилось четыре вида; два вида принадлежали к роду *Penicillium* Link, в остальных родах обнаружено по одному виду. Из осадков обоих морей были выделены изоляты трёх видов: *Ulocladium chartarum* (3 колонии, по одной в двух образцах из Баренцева и одна в образце из Карского моря), *Cladosporium cladosporioides* (всего 14 колоний, в четырех образцах из Баренцева моря и в четырех – из Карского), а также изоляты, морфологически сходные с видом *Cladosporium psychrotolerans* (3 колонии в двух образцах из Баренцева моря и 3 колонии в одном образце из Карского моря). Все остальные виды выделены из грунтов только одного из исследованных морей. Стерильных изолятов было выделено 13: 9 колоний в четырех образцах из Карского моря и 4 колонии – в четырех образцах из Баренцева моря (табл. 2). В грунтах обоих морей преобладали светлоокрашенные стерильные формы.

Относительно высокая численность стерильных мицелиев – обычная ситуация при культуральных исследованиях морских грибов. Они выделяются всегда, а в некоторых случаях могут входить в число доминантов. Например, неспороносящие культуры преобладали в глубоководных осадках Индийского океана (Damare et al., 2006) и в донных грунтах Карского моря (Bubnova, 2010), т.е. в самых экстремальных (глубоководных и холодных) из исследованных ранее районов Мирового океана. Высокое обилие стерильных форм вообще характерно для раз-

личных экстремальных местообитаний, в том числе холодноводных (Robinson, 2001). Виды рода *Cladosporium*, особенно *C. cladosporioides* и *C. sphaerospermum*, – одни из наиболее широко распространённых в мире грибов (Domsch et al., 2007). Имеются сведения, что они обычны в таких экстремально холодных местообитаниях, как почвы высокогорий, Арктики и Антарктики (Robinson, 2001; Hassan et al., 2016). Кроме того, отмечено, что *C. cladosporioides* может расти даже при -10°C (Onofri et al., 2004). Практически в любом культуральном исследовании морской микобиоты выделяют хотя бы один из этих видов, но ранее доминирование представителей данного рода в морских экотопах не было показано.

Вызывает интерес обнаружение изолятов, морфологически сходных с двумя другими видами рода *Cladosporium*: *C. fusiforme* и *C. psychrotolerans*. Оба вида близки к *C. sphaerospermum*; об их распространении известно пока немного, но оба связаны с различными гиперсалинными местообитаниями (Zalar et al., 2007). *C. fusiforme*, возможно, распространён несколько шире, чем *C. psychrotolerans*. Обнаруженный в грунтах обоих морей вид *U. chartarum* также является космополитом, обычным в различных экосистемах, в том числе морских (Domsch et al., 2007; Woudenberg et al., 2013). Остальные виды были представлены в основном единичными колониями в отдельных образцах. Экология этих видов чрезвычайно разнообразна: одни виды типичны для холодных регионов, другие – обычные обитатели жаркого климата. Например, единственный обнаруженный зигомицет *U. isabellina* обычен в почвах холодных и умеренно-холодных регионов, известен как психротолерант и олиготроф (Hassan et al., 2016); *Cadophora fastigiata* – почвенный сапротроф или ксилотроф, который также чаще встречается в средних и полярных широтах (Domsch et al., 2007; Hassan et al., 2016). В то же время *Aspergillus flavus* – космополитный вид, наиболее широко распространённый на разных субстратах в тропических и субтропических регионах; к тёплому и жаркому климату тяготеет и *Scopulariopsis brumptii* (Domsch et al., 2007). Из двух *Cephalosporium*-подобных грибов (*Gliomastix murorum* и *Sarocladium strictum*) первый является наиболее обычным почвенным видом этой группы, а второй часто упоминается в работах по морской микологии (Согонов, Марфенина, 1999; Domsch et al., 2007; Bubnova, 2010).

Неожиданным для нас явилось отсутствие в микобиоте таких территориальных психротолерантных компонентов, как *Pseudogymnoascus pannorum* или виды рода *Tolypocladium*, а также представителей рода *Penicillium*. Обильное присутствие *P. pannorum* и *Tolypocladium* spp. мы наблюдали в донных грунтах холодноводных Белого (Бубнова, 2009) и Карского (Bubnova, 2010) морей. Эти же виды обычны в почвах на побережьях арктических морей (Кирцидели, Томилин, 1997; Кирцидели, 1999) и в других экстремально холодных экосистемах (Hassan et al., 2016). Но в данном случае эти микромицеты отсутствовали, а род *Penicillium* был представлен тремя

изолятами двух довольно редких в целом видов. Среди выделенных нами грибов отсутствовали облигатно морские виды (Kohlmeyer, Kohlmeyer, 1979), если только таковыми не являлись стерильные изоляты.

Биомасса грибов

Общая биомасса грибов колебалась от 0.100 до 0.620 (в среднем 0.330) мг/г субстрата (табл. 3). Длина мицелия составляла от 0.8 до 11.1 м; численность спор в 1 г грунта варьировала от 9.3×10^3 до 3.5×10^5 ед./г сухого грунта. До настоящего времени для морских экотопов были известны данные лишь по биомассе мицелия (без учёта спор) в грунтах и почвах литорали Белого моря, где она составляла около 200 мг/г (Согонов, Марфенина, 1999), т.е. на 3–4 порядка выше, чем в исследованных нами донных осадках. Сходные с полученными нами порядки величин грибной биомассы известны только для таких экстремальных местообитаний, как арктические пустыни (Ball, Virginia, 2014) и различные экотопы Антарктики (Марфенина и др., 2016). Полученные нами величины на 4–6 порядков ниже всех известных значений, полученных для почв наземных биотопов. Например, в почвах приморских лугов побережья Белого моря биомасса мицелия (без учёта спор) достигает 2000 мг/г почвы, а в лесных почвах она ещё выше (Согонов, Марфенина, 1999). Если пересчитать на длину мицелия, то в одном грамме верхних горизонтов ненарушенных подзолистых почв Карелии сосредоточено от 780 до 1050 м мицелия; даже в минеральном горизонте Вf этих почв его длина достигала нескольких сотен метров (Предтеченская, 1994), а в гелисолах п-ва Таймыр в суровых арктических условиях – 393 м/г почвы (Shmidt, Bolter, 2002). Данных по численности спор в природных почвах и грунтах крайне мало; полученные нами значения на 3–5 порядков ниже известных из литературы. Например, в торфяных почвах Западной Сибири численность грибных спор составляет от 1.0×10^7 до 2.1×10^8 спор/г субстрата (Инишева, 2006; Филиппова, 2008).

Другой особенностью исследованных грунтов является то, что большая часть грибной биомассы в них представлена спорами (от 88 до 99.7%), а не мицелием (табл. 3). Подобное преобладание спор в биомассе ранее было показано только для биотопов Антарктиды (Д.А. Никитин и др., 2017). Опубликованные данные относятся к наземным экотопам. Доля мицелия в биомассе некоторых почв умеренных широт составляет от 70 до 99% (Филиппова, 2008). Следовательно, численность спор в донных грунтах изученных арктических морей относительно невелика, к тому же большая часть спор находится здесь в неактивном покоящемся состоянии. Их развитию, по-видимому, препятствуют низкая температура, низкое содержание кислорода, солёность и другие факторы.

В морфологии обнаруженных грибных структур также выявлены некоторые особенности. В частности, мицелий был преимущественно тонкий (около 3 мкм толщины). Некоторые мицелии имели артрический или бластический конидиогенез, характерный и для дрожжеподобных грибов. Пряжек на мицелии, встречающихся у некоторых базидиальных грибов, не отмечено. Каждый из образцов содержал артефакты в виде палочковидных структур длиной 3 мкм и шириной 1–1.5 мкм – предположительно, споры (конидии) грибов. Общая биомасса таких структур у каждого образца была незначительной (от 0.001 до 0.005 мг/г субстрата). Споры в основном (от 61 до 100%) были небольшого размера (< 3 мкм); крупных спор (> 5 мкм) выявлено очень мало. Биомасса грибов была наибольшей в образцах, в которых длина мицелия не была максимальной (табл. 3). Из этого мы можем предположить, что увеличение грибной биомассы в данных образцах (грунтах) связано с более интенсивной аккумуляцией спор, а не с развитием мицелия. Преобладание мелких спор ранее было отмечено для таких экстремальных местообитаний, как арктические (Schmidt, Bolter, 2002) и антарктические экосистемы (Марфенина и др., 2016).

Таблица 3. Биомасса мицелия и спор грибов в донных грунтах Баренцева моря

Номер станции	Мицелий		Биомасса спор			Общая биомасса спор	Суммарная биомасса
	биомасса	длина, м	диаметр, мкм				
			2	3	5		
БМ-02	0.014	11.1	0.073	0.260	0.051	0.384±0.03	0.398±0.04
БМ-03	0.011	8.7	0.099	0.280	0.051	0.430±0.04	0.441±0.04
БМ-04	0.004	3.2	0.094	0.186	0.017	0.297±0.02	0.301±0.03
БМ-05	0.007	5.6	0.116	0.175	0.051	0.342±0.03	0.349±0.04
БМ-06	0.012	9.5	0.069	0.019	0	0.088	0.100
БМ-07	0.005	4.4	0.049	0.153	0.068	0.270±0.03	0.275±0.04
БМ-08	0.003	2.4	0.076	0.157	0.068	0.301±0.03	0.304±0.03
БМ-09	0.007	5.6	0.110	0.349	0.153	0.613±0.06	0.620±0.06
БМ-10	0.010	7.9	0.023	0.073	0.005	0.101±0.01	0.111±0.01
БМ-11	0.010	7.9	0.104	0.164	0.136	0.404±0.04	0.414±0.04
БМ-12	0.002	1.6	0.059	0.153	0.136	0.348±0.03	0.350±0.03
БМ-13	0.001	0.8	0.089	0.142	0.068	0.299±0.03	0.300±0.03

Примечание. Биомасса мицелия и спор в мг/г грунта.

Таким образом, исследованные донные грунты удалённых от материка и относительно глубоководных районов Баренцева и Карского морей являются экстремально суровыми местообитаниями. Это отражается как на составе и численности микобиоты, так и на структуре грибной биомассы. Грибы здесь крайне малочисленны: численность КОЕ на 2–4 порядка ниже, чем в большинстве исследованных ранее морских грунтов, и на 2–6 порядков ниже, чем в различных наземных почвах. Необычна относительно высокая встречаемость дрожжевых форм, что может быть связано с определёнными условиями, складывающимися в данных экотопах (постоянно низкие температура и содержание кислорода, повышенная солёность и т.д.). В то же время состав микобиоты относительно разнообразен, но большинство видов встречалось как единичные колонии. Наиболее распространены представители рода *Cladosporium* (что впервые показано для морских грунтов, хотя виды данного рода обычны в различных холодных и засоленных местообитаниях) и стерильные формы (что вообще характерно для самых разных экстремальных местообитаний). Биомасса грибов очень низкая, она на 3–6 порядков ниже, чем в грунтах литорали и в наземных почвах. Подобные значения известны только для таких экстремальных местообитаний, как арктические пустыни и почвы Антарктиды. В структуре биомассы преобладают споры, что также можно считать маркёром экстремальности местообитания.

Авторы выражают признательность А.Б. Басину (Институт океанологии РАН) и В.В. Козловскому (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова) за помощь в сборе и доставке материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Артемичук Н.Я. Микофлора морей СССР. М.: Наука. 1981. 190 с.
- Бубнова Е.Н. Грибы донных грунтов Кандалакшского залива Белого моря // Микология и фитопатология. 2009. Т. 43, вып. 4. С. 4–11.
- Бубнова Е.Н. Грибы прибрежной зоны Чёрного моря в районе Голубой бухты (окрестности г. Геленджика) // Микология и фитопатология. 2014. Т. 48, вып. 1. С. 20–30.
- Инишева Л.И. Торфяные почвы: их генезис и классификация // Почвоведение. 2006. № 7. С. 781–786.
- Кирицели И.Ю. Почвенные микромицеты арктических тундр Таймырского побережья Карского моря // Микология и фитопатология. 1999. Т. 33, вып. 1. С. 19–23.
- Кирицели И.Ю., Томилин Б.А. Почвенные микромицеты архипелага Северная Земля // Микология и фитопатология. 1997. Т. 31, вып. 6. С. 1–6.
- Марфенина О.Е., Никитин Д.А., Иванова А.Е. Структура грибной биомассы и разнообразие культивируемых микромицетов в почвах Антарктиды (станции «Прогресс» и «Русская») // Почвоведение. 2016. № 8. С. 1–9.
- Никитин Д.А., Марфенина О.Е., Кудинова А.Г. и др. Микробная биомасса и бактериологическая активность почв и почвоподобных тел берегов оазисов Антарктиды // Почвоведение. 2017. № 7. С. 1–12.
- Пивкин М.В., Худякова Ю.В., Кузнецова Т.А. и др. Грибы акваторий прибрежных акваторий Японского моря в южной части Приморского края // Микология и фитопатология. 2005. Т. 39, вып. 6. С. 50–61.
- Пидопличко Н.М. Пенициллии (ключи для определения видов). Киев: Наукова думка. 1972. 150 с.
- Полянская Л.М., Гейдебрект В.В., Звягинцев Д.Г. Биомасса грибов в различных типах почв // Почвоведение. 1995. № 5. С. 566–572.
- Полянская Л.М., Звягинцев Д.Г. Содержание и структура микробной биомассы как показатель экологического состояния почв // Почвоведение. 2003. № 6. С. 706–714.
- Предтеченская О.О. Биомасса мицелия и урожайность макромицетов в сосняке брусничном средней подзоны тайги // Микология и фитопатология. 1994. Т. 28, вып. 4. С. 15–19.
- Согонов М.В., Марфенина О.Е. Особенности микобиоты приморских маршей Кандалакшского залива Белого моря // Вестн. МГУ. Сер. 16 (Биология). 1999. № 3. С. 42–47.
- Филиппова Н.В. К изучению микоченоза болот: некоторые данные о болотных микро- и макромицетах // Динамика окружающей среды и глобальные изменения климата: Сб. науч. тр. кафедры ЮНЕСКО ЮГУ. 2008. № 1. С. 141–156.
- Ball B.A., Virginia R.A. Microbial biomass and respiration responses to nitrogen fertilization in a polar desert // Polar Biol. 2014. Vol. 37, no. 4. P. 573–585.
- Bloem J., Bolhuis P.R., Veninga M.R., Wieringa J. Microscopic methods for counting bacteria and fungi in soil // Methods in applied soil microbiology and biochemistry / Eds K. Alef, P. Nannipieri: 1995. P. 162–173.
- Bubnova E.N. Fungal diversity in bottom sediments of the Kara Sea // Bot. Mar. 2010. Vol. 53, no. 6. P. 595–600.
- Damare S., Raghukumar C., Raghukumar S. Fungi in deep-sea sediments of the Central Indian basin // Deep-Sea Res. I. 2006. Vol. 53, no. 1. P. 14–27.
- Domsch K.H., Gams W., Anderson T.-H. Compendium of soil fungi: 2nd ed. Eching: IHW-Verlag. 2007. 672 p.
- Hassan N., Rafiq M., Hayat M. et al. Psychrophilic and psychrotrophic fungi: a comprehensive review // Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 2016. Vol. 15, no. 2. P. 147–172.
- Khudyakova Yu.V., Pivkin M.V., Kuznetsova T.A., Svetashev V.I. Fungi in sediments of the Sea of Japan and their biologically active metabolites // Microbiology. 2000. Vol. 69, no. 5. P. 608–611.
- Kohlmeyer J., Kohlmeyer E. Marine mycology: the higher fungi. New York: Academic Press. 1979. 693 p.
- Nagano Y., Nagahama T. Fungal diversity in deep-sea extreme environments // Fungal Ecol. 2012. Vol. 5. P. 463–471.
- Onofri S., Selbmann L., Zucconi L., Pagano S. Antarctic microfungi as models for exobiology // Planet. Space Sci. 2004. Vol. 52. P. 229–237.
- Raper K.B., Thom C.A. A manual of the Penicillia. Baltimore: Williams and Wilkins. 1949. 875 p.
- Robinson C.H. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi // New Phytol. 2001. Vol. 151, no. 2. P. 341–353.
- Samuel P., Princler L., Prabakaran P. Assessment of mycological diversity of marine sediment of south east coast of Tamilnadu, India // Eur. J. Exp. Biol. 2011. Vol. 1, no. 3. P. 130–138.
- Schmidt N., Bolter M. Fungal and bacterial biomass in tundra soils along an arctic transect from Taimyr Peninsula, central Siberia // Polar Biol. 2002. Vol. 25, no. 12. P. 871–877.
- Woudenberg J.H.C., Groenewald J.Z., Binder M., Crous P. *Alternaria* redefined // Stud. Mycol. 2013. Vol. 75. P. 171–212.
- Zalar P., de Hoog G.S., Schroers H.-J. et al. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments // Stud. Mycol. 2007. Vol. 58. P. 157–183.

АНТИОКСИДАНТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МАССОВЫХ ВИДОВ МАКРОВОДОРОСЛЕЙ ЯПОНСКОГО МОРЯ*

© 2017 И. М. Яковлева, Е. С. Белоциценко

Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского,
Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН, Владивосток 690041
e-mail: yakovleva72@mail.ru

Статья принята к печати 01.12.2016 г.

Определен диапазон вариабельности ключевых компонентов ферментативной и низкомолекулярной антиоксидантных систем (АОС) 17 массовых видов макроводорослей Японского моря в период их активного вегетативного роста в условиях минимальной антропогенной нагрузки. Установлено, что максимальная активность супероксиддисмутазы, глутатионредуктазы и аскорбатпероксидазы, а также наибольшее содержание глутатиона и каротиноидов характерны для представителей отдела Chlorophyta. Отмечена широкая фенотипическая вариабельность активности каталазы и содержания аскорбата в тканях исследованных водорослей. Выявлены различия в конститутивной ёмкости АОС между видами в пределах систематических отделов. Впервые показано, что тепловодные виды водорослей умеренных широт уступают холодноводным видам по содержанию низкомолекулярных антиоксидантов, но превосходят последние по активности ключевых антиоксидантных ферментов.

Ключевые слова: морские макроводоросли, антиоксидантные ферменты, низкомолекулярные антиоксиданты.

Antioxidant potential of dominant macroalgae species from the Sea of Japan. I. M. Yakovleva, E. S. Belotsitsenko (National Scientific Center of Marine Biology, A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041)

The range of variation in the key components of enzymatic and low-molecular-weight antioxidant systems (AOS) is determined for 17 dominant species of macroalgae from the Sea of Japan waters, exposed to minimal anthropogenic pressure, during the period of their active vegetative growth. The maximum activity of superoxide dismutase, glutathione reductase, ascorbate peroxidase, and the highest content of glutathione, carotenoids are observed in members of the phylum Chlorophyta. The studied algae display a wide phenotypic variability in terms of catalase activity and ascorbate abundance in their tissues. Differences between species in the constitutive capacity of AOS are found within the systematic phyla. It is shown for the first time that warm-water algae of temperate latitudes have a lower content of low-molecular-weight antioxidants and a higher activity of key antioxidant enzymes compared to those recorded for cold-temperate species. (Biologiya Morya, 2017, vol. 43, no. 5, pp. 372–382).

Keywords: marine macroalgae, antioxidant enzymes, low-molecular-weight antioxidants.

Макрофиты являются важнейшим компонентом морских прибрежных экосистем и вносят существенный вклад в продукцию первичного органического вещества Мирового океана (Lobban, Harrison, 1994). На мелководных участках шельфа макроводоросли часто подвергаются воздействию света высокой интенсивности и осушению, а также испытывают влияние резкого перепада температуры воды и солёности. Следствием этого могут быть повышение продукции активных форм кислорода (АФК) и последующий фотоокислительный стресс, приводящий к ингибированию и деструкции фотосинтетического аппарата растений (Bischof, Rautenberger, 2012). Способность к эффективной нейтрализации АФК является одним из определяющих критериев устойчивости морских фотосинтезирующих организмов к окислительному стрессу (Lesser, 2006). Поэтому антиоксидантный статус морских макрофитов может служить адекватным показателем стресс-устойчивости видов и успешности их адаптации к неблагоприятным условиям среды.

К общеизвестным системам детоксикации АФК у морских макроводорослей относят антиоксидантные ферменты супероксиддисмутазу (СОД), глутатионредуктазу (ГР), аскорбатпероксидазу (АПО), каталазу (КАТ) и такие низкомолекулярные антиоксиданты, как аскорбат, β -каротин и глутатион (Bischof, Rautenberger, 2012). Исследования последних лет показывают, что активность и содержание антиоксидантов в тканях макроводорослей могут варьировать в зависимости от их таксономической принадлежности (Ткаченко и др., 2004; Chakraborty et al., 2010), фазы жизненного цикла (Mizuta, Yasui, 2010) и вертикального распределения (Collén, Davison, 1999a, b), а также находиться под фотопериодическим контролем (Carvalho et al., 2004) и влиянием сезонных флуктуаций факторов среды (Lohrmann et al., 2004). Не исключено, что величина антиоксидантного потенциала макрофитов связана с их широтным распространением, как это показано ранее для высших растений (Wahid et al., 2007) и морских беспозвоночных (Abele, Puntarulo, 2004). Однако для ма-

*Работа выполнена в рамках госбюджетной темы ИБМ ДВО РАН № 115081110042, а также при поддержке гранта ДВО-1 № 12-1-ОБН-08.

кроводорослей сравнительные данные, подтверждающие или опровергающие эту гипотезу, отсутствуют.

К настоящему времени достаточно широкий мониторинг состояния антиоксидантных систем (АОС) водорослей проведен для представителей полярных районов (Aguilera et al., 2002, 2004). Имеется информация по данной тематике и для некоторых видов макрофитов, обитающих в субтропиках (Park et al., 2011; Шахматова, Мильчакова, 2014) и тропиках (Chakraborty et al., 2010; Khan et al., 2015). Для морских макроводорослей умеренных широт сведения об антиоксидантном потенциале ограничены работами, в которых на большом количестве видов проанализирован лишь один из компонентов АОС (Munda, 1987; Pawlik-Skowronska et al., 2007) или оценка АОС носит комплексный характер, но проведена для одного–трёх видов одного таксономического отдела и не всегда учитывает глубину обитания (Engels, 2011) или стадии жизненного цикла водорослей (Collén, Davison, 1999a, b).

В связи с этим целью данной работы было проведение комплексной оценки активности и содержания ключевых компонентов АОС макроводорослей умеренных широт, представленных видами из разных таксономических отделов, произрастающих на одной глубине и находящихся на одинаковой стадии вегетации. Для

реализации этой цели в качестве модельной акватории была выбрана прибрежная зона б. Соболев зал. Петра Великого Японского моря, которая в силу гидрологических условий отличается большим биоразнообразием макрофитобентоса, широко представленного как тепловодной, так и умеренной флорой (Перестенко, 1980). Полученные данные дополнительно проанализированы в контексте широтного распространения исследованных макрофитов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Активность и содержание компонентов АОС изучали у массовых видов япономорских макроводорослей, произрастающих на открытых участках верхней сублиторали на глубине 0.5–0.7 м в б. Соболев (зал. Петра Великого; 43°4'22" N, 131°58'0" E), которая характеризуется слабо выраженным антропогенным загрязнением (Тарасов и др., 2005). Время сбора водорослей (май – первая декада июня) соответствовало периоду активного вегетативного роста исследованных макрофитов. При отборе проб температура воды составляла 9–10°C, солёность – 32‰, концентрация растворенного неорганического азота – 0.45–0.75 мкМ/л, ортофосфатов – 0.34–0.36 мкМ/л, растворенного органического вещества – 0.46–2.44 мг/л.

Объектами исследования были 17 видов макроводорослей, среди них три вида зелёных, шесть видов бурых и восемь видов красных водорослей (табл. 1). Для анализа отбирали незатененные средние по размерам зрелые талломы водорослей каждого вида, не имеющие внешних повреждений. Время доставки во-

Таблица 1. Список исследованных макроводорослей Японского моря

Вид	Глубина, м	Биогеографическая принадлежность/тип ареала
Зеленые водоросли (Chlorophyta)		
<i>Ulva lactuca</i> Linnaeus	0.5	АркАтлИндПац/МЗ
<i>Ulva linza</i> Linnaeus	0.5	—
<i>Monostroma grevillei</i> (Thuret) Wittrock	0.5	АркАтлПац, Б-А/ИнЗ
Бурые водоросли (Ochrophyta, Phaeophyceae)		
<i>Costaria costata</i> (C. Agardh) Saunders	0.5	АтлПац, шБ/ИнЗ
<i>Punctaria plantaginea</i> (Ruth) Greville	0.5	АркАтлПац, шБ-А/ИнЗ
<i>Sargassum miyabei</i> Yendo	0.5	п, нБ-Т/ИнЗ
<i>Sargassum pallidum</i> (Turner) C. Agardh	0.5	п, нБ-СТ/ИнЗ
<i>Stephanocystis crassipes</i> Draisma, Ballesteros, F. Rousseau & T. Thibaut	0.5	п, шБ/З
<i>Undaria pinnatifida</i> (Harvey) Suringar	0.7	АтлПац, нБ-СТ-Н/ИнЗ
Красные водоросли (Rhodophyta)		
<i>Ahnfeltiopsis flabelliformis</i> (Harvey) Masuda	0.7	АтлПац, Б-Т-Н/ИнЗ
<i>Chondrus pinnulatus</i> (Harvey) Okamura	0.7	п, нБ/З
<i>Grateloupia divaricata</i> Okamura	0.5	т, нБ-Т-Н/ИнЗ
<i>Laurencia nipponica</i> Yamada	0.5	п, нБ-СТ/З
<i>Neorhodomella larix</i> (Turner) Masuda	0.5	т, шБ/З
<i>Palmaria stenogona</i> Perestenko	0.7	п, шБ/З
<i>Polysiphonia morrowii</i> Harvey, Grey	0.5	нБ-СТ-Н/ИнЗ
<i>Tichocarpus crinitus</i> (Gmelin) Ruprecht	0.5	п, шБ/З

Примечание. Биогеографическая принадлежность вида: АтлПац – атлантико-тихоокеанский; АркАтлПац – арктико-атлантико-тихоокеанский; АркАтлИндПац – арктико-атлантико-индо-тихоокеанский; Б-А – бореально-арктический; Б-Т-Н – бореально-тропическо-нотальный; нБ – низкобореальный; нБ-СТ – низкобореально-субтропический; нБ-СТ-Н – низкобореально-субтропическо-нотальный; нБ-Т – низкобореально-тропический; нБ-Т-Н – низкобореально-тропическо-нотальный; п – приазиатский (западнотихоокеанский); т – тихоокеанский (распространенный по обоим берегам Тихого океана); шБ – широкобореальный; шБ-А – широкобореально-арктический. Тип ареала вида: З – зональный; ИнЗ – интерзональный; МЗ – мультizonальный (по: Guiry, Guiry, 2016).

дорослей от места сбора до лаборатории не превышало 30 мин. Образцы перевозили в тёмных сосудах с морской водой при постоянной аэрации. Для исследования водорослей *Monostroma grevillei*, *Punctaria plantaginea*, *Ahnfeltiopsis flabelliformis*, *Chondrus pinnulatus*, *Laurencia nipponica* и *Polysiphonia morrowii* отбирали стерильные талломы массой 1–2 г и использовали их полностью. При изучении остальных водорослей использовали только вегетативные части талломов одной возрастной генерации; отбор проб проводили согласно Ли (1978). В биологическую пробу входило 1–3 растения. Количество биологических проб для каждого анализа по каждому виду составляло 9–15. Водоросли очищали от эпифитов, взвешивали, фиксировали в жидком азоте и хранили при температуре –80°C в течение 2–3 сут до начала анализа.

Для определения активности антиоксидантных ферментов и содержания растворимого белка перемолотые в жидком азоте образцы (0.3–0.5 г сыр. массы) экстрагировали в 2–3 мл охлажденного 50 мМ К-фосфатного буфера (pH 7.4), содержащего 1% ПВП-10, 1 мМ ЭДТА, 0.05% Тритон X-100 и 1 мМ L-аскорбат в 1 мл раствора. Для анализа содержания общего аскорбата (AsA) и глутатиона (GSH+GSSG, далее – GSH) образцы (0.8–1.0 г сыр. массы) экстрагировали соответственно в 4–5 мл охлажденной 6% трихлоруксусной или 6% сульфосалициловой кислоты. Все процедуры проводили при температуре 2–4°C. Полученные экстракты инкубировали на льду в ультразвуковой бане в течение 10 мин. Затем гомогенаты тканей водорослей центрифугировали при 13 тыс. об/мин в течение 15 мин при 4°C. Супернатанты собирали и хранили на льду до начала анализа. Срок хранения не превышал 1–2 ч.

При определении активности ферментов и содержания антиоксидантов использовали реактивы фирмы Sigma (США). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ-2000 (Россия). Активность СОД (ЕС 1.15.1.1) определяли по методу, основанному на ингибировании фотохимического восстановления красителя нитросинего тетразолия (НСТ) радикалами $O_2^{\cdot-}$ до формазана на ярком свете (Beyer, Fridovich, 1987). За реакцией следили по изменению оптической плотности при 560 нм. За единицу активности СОД принимали количество фермента, вызывающего ингибирование фотовосстановления НСТ на 50%. Специфическую активность фермента выражали в относительных единицах (отн. ед.) на 1 мг белка. Активность ГР (ЕС 1.6.4.2) определяли по кинетике окисления НАДФ•Н (Goldberg, Spooner, 1983) и выражали в мкмоль окисленного НАДФ•Н на 1 мг белка в мин. Активность АПО (ЕС 1.11.1.11) оценивали по кинетике окисления AsA (Nakano, Asada, 1981) и выражали в мкмоль окисленного AsA на 1 мг белка в мин. Активность КАТ (ЕС 1.11.1.6) определяли по скорости разложения H_2O_2 (Beers, Sizer, 1952) и выражали в отн. ед. на 1 мг белка. Содержание общего AsA определяли по методу, основанному на реакции восстановления аскорбатом Fe^{3+} до Fe^{2+} (Gillespie, Ainsworth, 2007) и выражали в мкмоль/г сух. массы. Содержание общего GSH определяли по методу, основанному на последовательном окислении глутатиона 5,5-дитиобис-2-нитробензойной кислотой (Anderson, 1985) и выражали в мкмоль/г сух. массы. Суммарное содержание каротиноидов (КАР) анализировали методами, описанными Ли (1978), и выражали в мг/г сух. массы. Содержание растворимого белка определяли методом, основанным на связывании белками красителя Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bradford, 1976).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 7.0 (StatSoft Inc.). Перед проведением статистического анализа для получения нормального

распределения данных их трансформировали по методу арксинуса. Для оценки статистических различий трансформированные данные подвергали дисперсионному анализу (one-way ANOVA) с последующим использованием многогранного Тьюки HSD-теста. Достоверными считали различия при уровне значимости $P < 0.05$. Для анализа сходства видов использовали агрегативный метод древовидной кластеризации: методы ближайшего связывания (neighbor-joining) и Уорда (Ward's method). Значимость различий полученных кластеров оценивали при помощи бутстреп-анализа по 1 тыс. реплик (Шитиков, Розенберг, 2013).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При сравнении активности антиоксидантных ферментов (рис. 1) и содержания низкомолекулярных антиоксидантов (рис. 2) в ряде случаев зарегистрирована зависимость конститутивной ёмкости АОС от таксономической принадлежности макроводорослей к разным отделам (табл. 2). Так, максимальные активность СОД, ГР и АПО, а также наибольшее содержание GSH и КАР выявлены у представителей Chlorophyta (рис. 1А–В, 2Б–В). Минимальные активность СОД, ГР, АПО и содержание GSH зарегистрированы у водорослей из отдела Ochrophyta. Водоросли из отдела Rhodophyta по уровню этих антиоксидантных компонентов занимали промежуточное положение. Активность КАТ и содержание AsA были сопоставимы у представителей Chlorophyta, Ochrophyta и Rhodophyta (рис. 1Г, 2А). Минимальный уровень КАР отмечен в тканях багряннок (рис. 2В).

В пределах отделов амплитуда вариаций активности и содержания большинства компонентов АОС у изученных водорослей носит видоспецифичный характер (табл. 3). Вместе с тем статистически значимой зависимости активности ГР и АПО у представителей Chlorophyta, а также активности КАТ у представителей Ochrophyta и Rhodophyta от видовой принадлежности водорослей нами не выявлено (табл. 3). Проведенная иерархическая кластеризация зелёных, бурых и красных водорослей по активности и содержанию антиоксидантных компонентов, статистически достоверно зависевших от видовой принадлежности макрофитов, показала, что внутри систематических отделов конститутивная ёмкость АОС исследованных водорослей зависит от их биогеографии (рис. 3). Так, представители отдела Chlorophyta на уровне сходства активности СОД и КАТ (рис. 3А), а также на уровне сходства содержания антиоксидантов (рис. 3Б) группируются в два кластера. Первый кластер включает бореально-арктический вид *Monostroma grevillei*, а второй кластер представлен мультизональными видами *Ulva lactuca* и *U. linza* и имеет бутстреп-поддержку 99%. У видов рода *Ulva* активность СОД и КАТ (рис. 1А), а также содержание GSH (рис. 2Б) в 1.5 раза ($P < 0.05$) превышали таковые у *M. grevillei*. Напротив, содержание AsA и КАР в тканях *M. grevillei* было в 1.5–1.8 раза ($P < 0.05$) выше, чем в тканях *U. lactuca* и *U. linza* (рис. 2А, В).

Представители отдела Ochrophyta на уровне сходства активности СОД, ГР, АПО (рис. 3В) и содержания

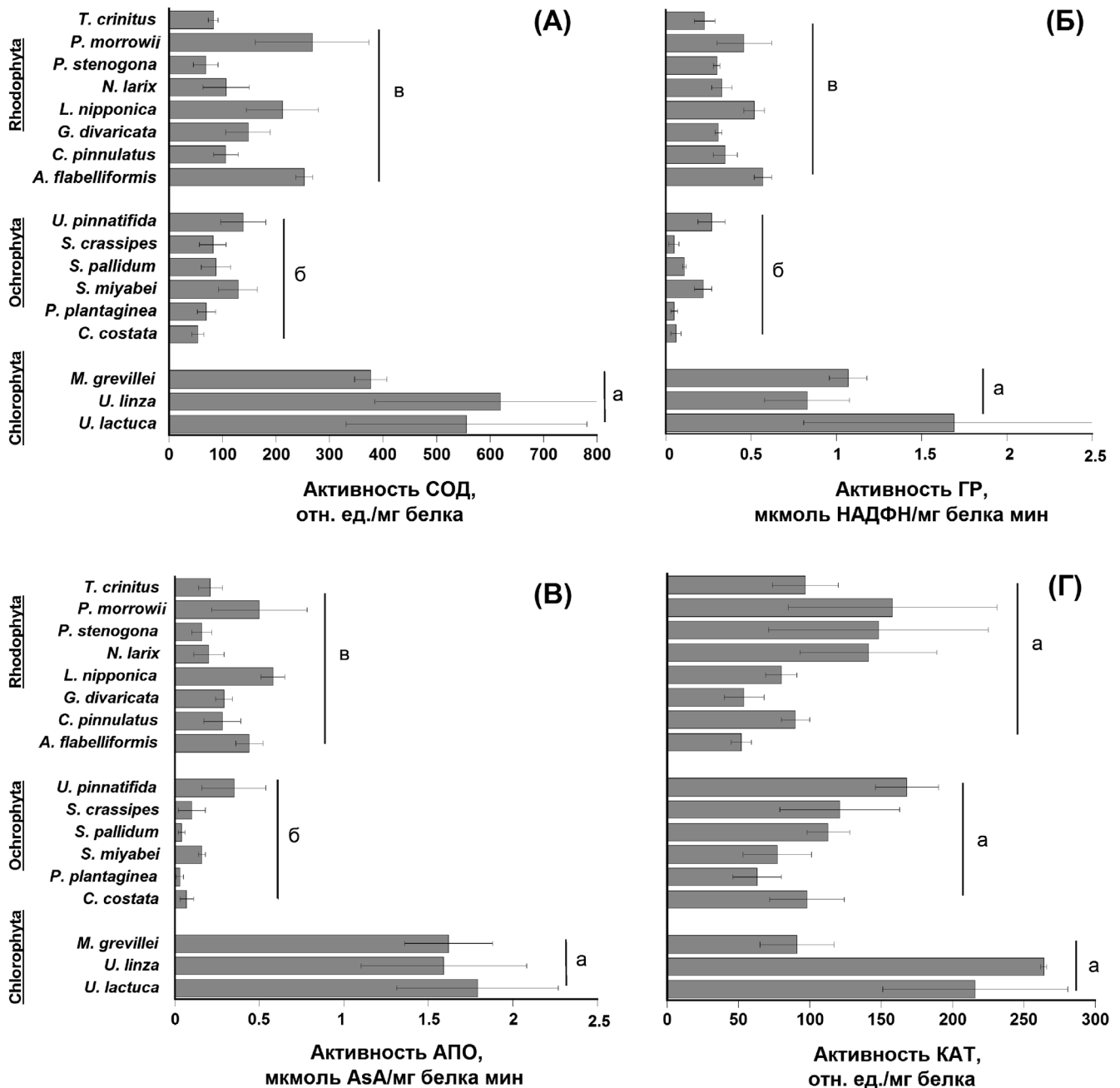


Рис. 1. Активность супероксиддисмутазы, СОД (А); глутатионредуктазы, ГР (Б); аскорбатпероксидазы, АПО (В) и каталазы, КАТ (Г) в тканях макроводорослей из б. Соболя (Японское море). Здесь и на рис. 2 представлены среднеарифметические значения $\pm$ SD, $n = 9-15$; одинаковые буквенные индексы, расположенные справа от вертикальной черты, показывают отсутствие статистически значимых различий в значениях параметра между систематическими отделами при $P < 0.05$ (Тьюки HSD-тест).

антиоксидантов (рис. 3Г) образуют четыре кластера, объединенных в две группы, каждая из которых имеет бутстреп-поддержку, превышающую 70%. Первую группу составляют четыре вида: бореально-арктический *Punctaria plantaginea*, широкобореальные *Costaria costata*, *Stephanocystis crassipes* и субтропическо-низкобореальный *Sargassum pallidum*. Вторая группа включает один кластер, образованный тропическо-субтропическо-низкобореальными видами *Sargassum miyabei* и *Undaria pinnatifida*. У последних видов активность СОД, ГР, АПО

была в 2–5 раз ($P < 0.05$) выше, а содержание AsA, GSH и КАТ в среднем было в 2–3 раза ($P < 0.05$) ниже, чем у видов первой группы (рис. 1А–В, 2).

Исследованные багрянки на основании сходства активности СОД, ГР, АПО (рис. 3Д) и содержания антиоксидантов (рис. 3Е) группируются в пять кластеров, формирующих две группы, каждая из которых имеет бутстреп-поддержку, превышающую 80%. В первую группу выделены тропическо-субтропическо-низкобореальные виды *Ahnfeltiopsis flabelliformis*, *Laurencia nipponica*

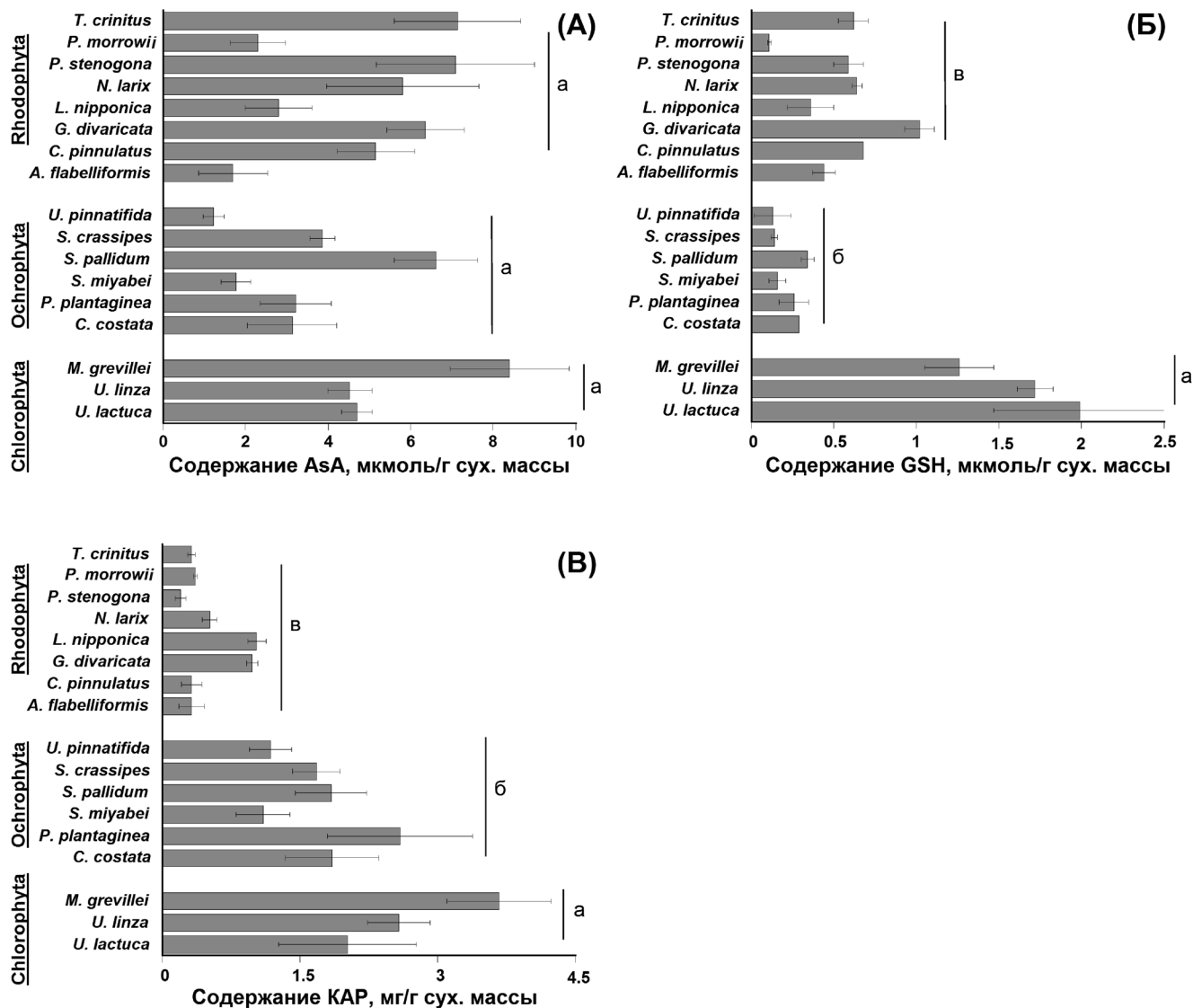


Рис. 2. Общее содержание аскорбата, AsA (A); глутатиона, GSH (Б) и каротиноидов, КАР (B) в тканях макроводорослей из б. Соболев (Японское море).

Таблица 2. Зависимость активности и содержания антиоксидантных компонентов от таксономической принадлежности водорослей к отделам Chlorophyta, Ochrophyta, Rhodophyta по результатам однофакторного дисперсионного анализа

Группирующая переменная	Зависимая переменная	df	MS	F	P
Отдел	СОД	2, 185	3.1706	178.7631	0.0000
	ГР	2, 184	0.0626	243.3740	0.0000
	АПО	2, 184	0.1028	321.3187	0.0000
	КАТ	2, 184	0.0032	0.3913	0.6770
	AsA	2, 204	0.0091	2.7718	0.0649
	GSH	2, 170	0.0685	236.3893	0.0000
	Кар	2, 173	0.1099	231.8380	0.0000

Примечание. СОД – супероксиддисмутаза, ГР – глутатионредуктаза, АПО – аскорбатпероксидаза, КАТ – каталаза, AsA – аскорбат, GSH – глутатион, КАР – каротиноиды.

Таблица 3. Зависимость активности и содержания антиоксидантных компонентов от видовой принадлежности водорослей внутри систематических отделов по результатам однофакторного дисперсионного анализа

Группирующая переменная	Зависимая переменная	df	MS	F	P
Chlorophyta					
Вид	СОД	2, 30	0.1812	3.7615	0.0349
	ГР	2, 29	0.0017	1.8723	0.1719
	АПО	2, 29	0.0002	0.6451	0.5319
	КАТ	2, 26	0.0958	19.0388	0.0001
	AsA	2, 37	0.0281	80.6185	0.0000
	GSH	2, 26	0.0016	5.3195	0.0116
	КАР	2, 26	0.0065	16.3240	0.0000
Ochrophyta, Phaeophyceae					
Вид	СОД	5, 57	0.0315	13.7195	0.0000
	ГР	5, 57	0.0020	37.9688	0.0000
	АПО	5, 49	0.0017	29.5071	0.0000
	КАТ	5, 57	0.0086	2.2896	0.0576
	AsA	5, 76	0.0326	51.8300	0.0000
	GSH	5, 57	0.0011	15.0541	0.0000
	КАР	5, 57	0.0043	16.9650	0.0000
Rhodophyta					
Вид	СОД	7, 63	0.1039	22.9627	0.0000
	ГР	7, 63	0.0008	25.4196	0.0000
	АПО	7, 71	0.0021	15.0493	0.0000
	КАТ	7, 63	0.0086	1.1047	0.3714
	AsA	7, 93	0.0401	39.8092	0.0000
	GSH	7, 63	0.0037	93.0177	0.0000
	КАР	7, 65	0.0043	93.8638	0.0000

Примечание. СОД – супероксиддисмутаза, ГР – глутатионредуктаза, АПО – аскорбатпероксидаза, КАТ – каталаза, AsA – аскорбат, GSH – глутатион, КАР – каротиноиды.

и *Polysiphonia morrowii*. Вторая группа объединяет бореальные виды *Chondrus pinnulatus*, *Neorhodomella larix*, *Palmaria stenogona* и *Tichocarpus crinitus*, а также тропическо-низкобореальный вид *Grateloupia divaricata*. В тканях багрянок, образующих первую группу, активность СОД, ГР и АПО в 2–2.5 раза ($P < 0.05$) превышала таковую у видов, входящих во вторую группу (рис. 1А–В). Содержание AsA и GSH у *A. flabelliformis*, *L. nipponica* и *P. morrowii*, напротив, было в 2.5–3 раза ниже ($P < 0.05$), чем у бореальных видов и *G. divaricata* (рис. 2А–Б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Потенциал антиоксидантной системы (АОС) морских автотрофов является важным элементом их биохимической защиты, направленной на обеспечение стрессустойчивости видов. Однако оценка состояния АОС макрофитов невозможна без определения диапазона варьирования её количественных показателей в оптимальных условиях существования водорослей. В настоящей работе впервые приведены количественные характеристики АОС 17 массовых видов япономорских макроводорослей в период их активного вегетативного роста на открытых

участках верхней сублиторали, не подверженной антропогенному воздействию, а также обобщены немногочисленные литературные данные о конститутивном уровне активности и содержания компонентов АОС у разных таксонов макроводорослей прибрежной зоны умеренных широт.

В целом выявленные нами диапазоны активности СОД, ГР, АПО, КАТ и содержания AsA, GSH в тканях верхнесублиторальных макрофитов из относительно чистой акватории б. Соболя находятся в пределах величин, отмеченных ранее для зелёных, бурых и красных водорослей, обитающих на мелководных участках шельфа умеренных широт при минимальной антропогенной нагрузке (табл. 4). Диапазон вариаций общего содержания КАР в тканях исследованных нами макрофитов также сопоставим с ранее опубликованными данными для водорослей как зал. Петра Великого Японского моря (Ли, Титлянов, 1978), так и других прибрежных районов умеренного пояса (Bianchi et al., 1997). Вместе с тем обращают на себя внимание показатели зелёной водоросли *Ulva linza* (ранее *Enteromorpha ahneriana*) из прибрежных вод северной Балтики (Choo et al., 2004), у которой

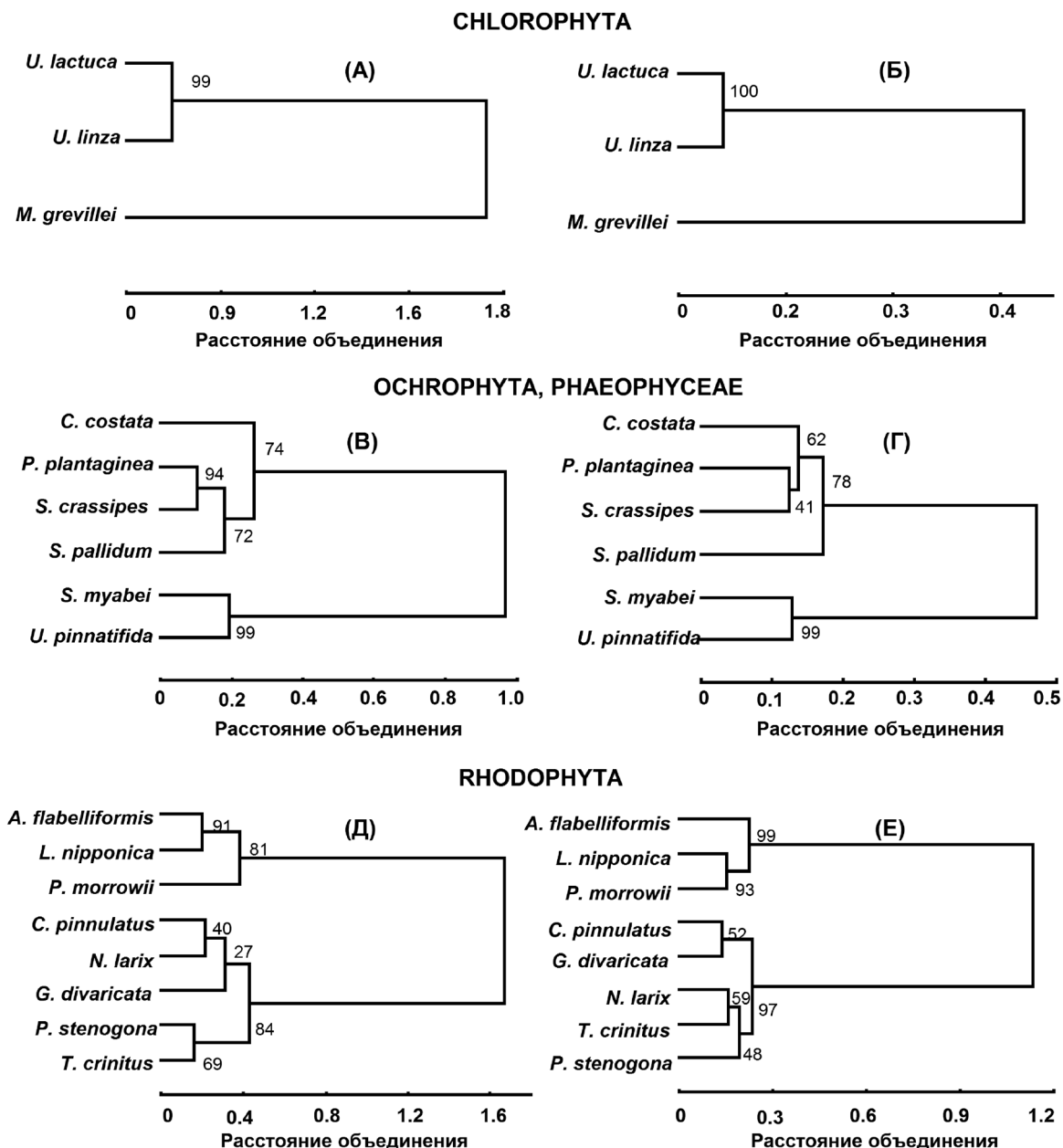


Рис. 3. Дендрограммы сходства макроводорослей из б. Соболев (Японское море) внутри систематических отделов: Chlorophyta – на уровнях активности СОД, КАТ (А) и содержания AsA, GSH, КАР (Б); Ochrophyta, Phaeophyceae – на уровнях активности СОД, ГР, АПО (В) и содержания AsA, GSH, КАР (Г); Rhodophyta – на уровнях активности СОД, ГР, АПО (Д) и содержания AsA, GSH, КАР (Е). Для кластеров над ветвями указаны индексы бутстрепа (% от 1 тыс. реплик), полученные по методу Уорда.

активность СОД, АПО и КАТ на порядок ниже значений, зарегистрированных нами и другими исследователями для бореальных представителей рода *Ulva* (табл. 4). По нашему мнению, такие расхождения, вероятно, связаны с различиями в солевом режиме акваторий, где были собраны водоросли. Известно, что фотосинтетическая активность макрофитов солоноватого Балтийского моря в норме значительно ниже, чем у аналогичных видов, обитающих при нормальной морской солёности (Gylle et al., 2013). Пониженная скорость фотосинтеза у автотрофных организмов обычно сопряжена с низким уровнем продукции АФК в их тканях (Asada, 2006). В этих усло-

виях поддержание клетками высокого АОС потенциала, требующее существенных энергетических затрат, по-видимому, нецелесообразно.

Общей закономерностью для всех исследованных нами макрофитов является более высокий уровень активности ключевых антиоксидантных ферментов у зелёных водорослей по сравнению с бурыми и красными (рис. 1А–В). Так, в ряду Chlorophyta > Rhodophyta > Ochrophyta отмечено убывание активности СОД, играющей ведущую роль в утилизации супероксид-анион радикала и продуцировании H_2O_2 (Alscher et al., 2002), и активности как ГР, так и АПО, участвующих в элиминации H_2O_2 в хло-

Таблица 4. Активность антиоксидантных ферментов и содержание антиоксидантов у макроводорослей мелководья умеренной зоны Мирового океана при минимальной антропогенной нагрузке

Вид	Место сбора	СОД	ГР	АПО	КАТ	AsA	GSH	Источник
Chlorophyta								
[<i>M. grevillei</i>]*	Сев. Пацифика, Японское море	347–407 ¹	0.9–1.2 ²	1.4–1.9 ²	65–123 ²	0.2–0.4 ⁵ 1.2–2.3 ⁶	1.0–1.5 ⁴ 0.2–0.3 ⁶	Настоящее исследование
[<i>U. lactuca</i> , <i>U. linza</i>]*	Сев. Пацифика, Японское море	331–853 ¹	0.5–2.6 ²	1.1–2.3 ²	135–269 ²	0.1–0.2 ⁵ 0.3–0.9 ⁶	1.6–2.5 ⁴ 0.2–0.5 ⁶	Настоящее исследование
<i>Ulva pertusa</i>	Ю-з Пацифика	250–600 ¹	0.5–1.4 ²	0.8–2.5 ²	н.д.	1.5–1.7 ⁶	0.1–0.3 ⁶	Engels, 2011
<i>U. intestinales</i>	Сев. Атлантика	н.д.	1.1–2.8 ²	н.д.	40–200 ²	н.д.	н.д.	Aguilera et al., 2004
<i>U. intestinales</i>	Сев. Атлантика	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	1.2–1.5 ⁴	Pawlik-Skowronska et al., 2007
<i>U. lactuca</i>	Сев. Атлантика	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	1.1–1.7 ⁴	Pawlik-Skowronska et al., 2007
<i>U. linza</i>	Сев. Балтика	12–25 ¹	н.д.	0.1–0.4 ²	0.2–2.5 ²	н.д.	н.д.	Choo et al., 2004
<i>Ulva</i> sp.	Сев. Адриатика	600–700 ¹	н.д.	н.д.	150–250 ²	н.д.	н.д.	Schiavon et al., 2012
<i>Ulva</i> spp.	Сев. Адриатика	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0.1–0.3 ⁵	н.д.	Munda, 1987
Ochrophyta, Phaeophyceae								
[<i>C. costata</i> , <i>P. plantaginea</i> , <i>S. pallidum</i> , <i>S. crassipes</i>]*	Сев. Пацифика, Японское море	19–70 ^{1a}	0.0–0.1 ² 0.1–0.7 ³	0.1– 0.2 ² 0.1– 0.6 ³	46–175 ² 84–528 ³	2.0–7.6 ⁴ 0.1–0.3 ⁵ 0.3–1.5 ⁶	0.1–0.4 ⁴ 0.1–0.2 ⁶	Настоящее исследование
[<i>S. miyabei</i> , <i>U. pinnatifida</i>]*	Сев. Пацифика, Японское море	36–130 ^{1a}	0.1–0.4 ² 1.1–2.7 ³	0.1– 0.7 ² 0.7– 4.2 ³	53–190 ² 244–627 ³	0.9–2.1 ⁴ < 0.1 ⁵ 0.1–0.6 ⁶	0.1–0.2 ⁴ 0.0–0.1 ⁶	Настоящее исследование
<i>Scytosiphon lomentaria</i>	Ю-в Пацифика	н.д.	0.1–0.2 ²	0.3–0.4 ²	18–90 ²	3.9–4.3 ⁴	0.9–1.1 ⁴	Contreras et al., 2005
<i>Fucus</i> spp.	Сев. Атлантика	23–55 ^{1a}	0.1–0.3 ³	0.5–1.7 ³	66–403 ³	1.5–5.3 ⁶	0.2–0.7 ⁶	Collen, Davison, 1999a
<i>Fucus</i> spp.	Сев. Атлантика	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	1.6–2.3 ⁴	Pawlik-Skowronska et al., 2007
<i>Cystoseira compressa</i>	Сев. Адриатика	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0.4–0.6 ⁵	н.д.	Munda, 1987
<i>Fucus virsoides</i>	Сев. Адриатика	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0.5–0.9 ⁵	н.д.	Munda, 1987
<i>Scytosiphon lomentaria</i>	Сев. Адриатика	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0.2–0.3 ⁵	н.д.	Munda, 1987
Rhodophyta								
[<i>C. pinnulatus</i> , <i>N. larix</i> , <i>P. stenogona</i> , <i>T. crinitus</i> , <i>G. divaricata</i>]*	Сев. Пацифика, Японское море	75–150 ¹	0.2–0.4 ² 1.5–3.4 ³	0.7–2.0 ³	40–230 ² 220–680 ³	0.1–0.3 ⁵ 1.3–1.9 ⁶	0.6–1.0 ⁴ 0.1–0.2 ⁶	Настоящее исследование
[<i>A. flabelliformis</i> , <i>L. nipponica</i> , <i>P. morrowii</i>]*	Сев. Пацифика, Японское море	106–270 ¹	0.3–0.6 ² 2.0–4.6 ³	1.8–3.3 ³	38–235 ² 220–660 ³	< 0.1 ⁵ 0.2–0.4 ⁶	0.1–0.4 ⁴ < 0.1 ⁶	Настоящее исследование
<i>Porphyra umbilicalis</i>	Сев. Атлантика	н.д.	0.1–2.5 ²	н.д.	40–210 ²	н.д.	н.д.	Aguilera et al., 2004
<i>Mastocarpus stellatus</i>	Сев. Атлантика	70–280 ¹	0.4–1.0 ³	3.8–5.5 ³	55–68 ³	1.5–2.2 ⁶	0.1–0.2 ⁶	Collen, Davison, 1999b; Lohrmann et al., 2004
<i>Chondrus crispus</i>	Сев. Атлантика	100–280 ¹	0.2–0.3 ³	3.2–4.8 ³	22–35 ³	0.6–2.0 ⁶	0.1–0.2 ⁶	Collen, Davison, 1999b; Lohrmann et al., 2004
<i>Gracilaria gracilis</i>	Сев. Атлантика	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	1.4–1.7 ⁴	Pawlik-Skowronska et al., 2007
<i>Solieeria chordales</i>	Сев. Атлантика	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0.8–1.0 ⁴	Pawlik-Skowronska et al., 2007
<i>Ceramium cilliaium</i>	Сев. Адриатика	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0.2–0.5 ⁵	н.д.	Munda, 1987
<i>Halopitys incuvus</i>	Сев. Адриатика	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0.1–0.2 ⁵	н.д.	Munda, 1987

*Полные видовые названия водорослей представлены в табл. 1.

Примечание. Сев. – северная, Ю-з – юго-западная, Ю-в – юго-восточная, н.д. – нет данных. Надстрочными цифровыми индексами отмечена размерность, в которой выражены активность ферментов (¹отн. ед./мг белка, ^{1a}отн. ед./г сыр. массы, ²мкмоль субстрата/мг белка мин, ³мкмоль субстрата/г сыр. массы мин) и содержание антиоксидантов (⁴мкмоль/г сух. массы, ⁵мг/г сыр. массы, ⁶мкмоль/г сыр. массы).

ропластах (Asada, 2006). Наши результаты подтверждают данные, полученные ранее при исследовании макроводорослей северной Атлантики (Collen, Davison, 1999a, b) и Арктики (Aguilera et al., 2002), согласно которым у красных и бурых водорослей мелководья потенциал ферментативной АОС значительно ниже, чем у представителей зелёных водорослей. В пользу этого утверждения свидетельствуют также недавно полученные сравнительные данные по активности ГР и АПО у макрофитов субтропиков (Park et al., 2011; Flores-Molina et al., 2014).

Следует отметить широкую фенотипическую вариабельность активности КАТ у макроводорослей из б. Соболя, вследствие которой нам не удалось зарегистрировать достоверные различия по этому параметру между представителями разных систематических отделов (табл. 2, рис. 1Г). Аналогичные результаты получены в работах, выполненных на макрофитах из относительно чистых акваторий побережья Чили (Flores-Molina et al., 2014) и Чёрного моря (Шахматова, Мильчакова, 2014). В то же время, в работе этих авторов отмечено, что в условиях антропогенного загрязнения активность КАТ зелёных и бурых водорослей может значительно уступать таковой багряннок. Близкие данные получены и для макрофитов Красного моря в условиях высоких концентраций нитратов в воде (Khan et al., 2015).

Исследованные нами представители отделов Ochrophyta и Rhodophyta отличаются не только низким уровнем активности ферментативной АОС, но и сравнительно невысоким содержанием некоторых ключевых низкомолекулярных антиоксидантов (рис. 2Б, В). Это относится к глутатиону (GSH) – одному из основных компонентов антипероксидной системы клеток в гидрофильной среде (Asada, 2006), а также к липофильным антиокислителям каротиноидам (КАР), известным своей способностью дезактивировать синглетный кислород ($^1\text{O}_2$) и пероксил-радикал ($\text{ROO}^\bullet$) (Telfer et al., 1994). Зарегистрированные нами тенденции к убыванию содержания GSH в ряду Chlorophyta > Rhodophyta > Ochrophyta и к падению уровня КАР в ряду Chlorophyta > Ochrophyta > Rhodophyta отмечают и другие исследователи. Например, на подобный феномен указывают Ткаченко с соавторами (2004) при сравнении потенциала глутатионовой системы между зелёными и красными водорослями Чёрного моря, а также Ли и Титлянов (1978) при сопоставлении размеров пула каротиноидов между таксонами морских макрофитов Японского моря. По-видимому, преимущественную роль в детоксикации АФК и обеспечении стрессустойчивости у зелёных водорослей играют универсальные компоненты ферментативной и низкомолекулярной АОС, тогда как у бурых и красных водорослей их вклад минимален. Тем не менее содержание аскорбата (AsA) у зелёных, бурых и красных водорослей из б. Соболя статистически значимо не различалось (табл. 2, рис. 2А). Это не противоречит данным сравнительных исследований макрофитов умеренного пояса из северной Адриатики (Munda, 1987) и северной Атлантики (Collen, Davison,

1999a, b). Однако в мониторинговых работах, выполненных на водорослях Арктики (Aguilera et al., 2002) и тропиков (Chakraborty et al., 2010), представители отделов Ochrophyta и Rhodophyta по уровню этого низкомолекулярного антиоксиданта значительно уступали видам из отдела Chlorophyta.

Сравнительно низкие показатели универсальных компонентов АОС у представителей отделов Ochrophyta и Rhodophyta предполагают наличие у них альтернативных механизмов антиоксидантной защиты, в частности, накопление соединений, потенциально способных участвовать в перехвате АФК. Так, в тканях бурых водорослей присутствуют полифенольные соединения – флоротаннины, которые считаются основной составляющей антиоксидантного потенциала представителей этого таксона (Connan et al., 2006). У красных водорослей дополнительную антиоксидантную функцию могут выполнять микоспорин-подобные аминокислоты (Coba et al., 2009). Кроме этого водоросли обоих отделов аккумулируют в тканях сульфатированные полисахариды, проявляющие *in vitro* в отношении большинства АФК умеренную антиоксидантную активность (Jiao et al., 2011). Вместе с тем не исключено, что стратегия антиоксидантной защиты у исследованных нами видов бурых и красных водорослей осуществляется не за счёт поддержания стабильно высокого уровня активности АОС, а путем активации её компонентов и высокой скорости их регенерации непосредственно во время стресса. Подтверждение этой гипотезы требует дальнейших исследований.

Следует отметить, что различия в конститутивной ёмкости АОС макрофитов из б. Соболя обнаружены не только между представителями систематических отделов, но и между видами в пределах каждого из них (табл. 3). Данный феномен не может быть связан с вертикальным распределением водорослей (Aguilera et al., 2002) или с фазой их жизненного цикла (Mizuta, Yasui, 2010), так как исследованные нами растения произрастали на одной глубине и находились на одинаковой стадии вегетации. Тем не менее полученные нами результаты иерархической кластеризации видов на уровне антиоксидантных компонентов убедительно демонстрируют зависимость конститутивной ёмкости АОС япономорских макрофитов от их биогеографии: холодноводные (бореальные и бореально-арктические) водоросли уступают тепловодным (тропическо-бореальным и субтропическо-низкобореальным) видам по активности основных компонентов ферментативной АОС, но превосходят последние по уровню универсальных низкомолекулярных антиоксидантов (рис. 2, 3). Подобную закономерность ранее неоднократно отмечали для высших растений (Wahid et al., 2007) и морских беспозвоночных (Abele, Puntarulo, 2004), но для макроводорослей это показано нами впервые.

Обращает на себя внимание антиоксидантный статус бурой водоросли *Sargassum pallidum* и багрянки *Grateloupia divaricata*, которые по данным Algaebase (Guiry, Guiry, 2016) относят соответственно к субтропи-

ческо-низкобореальному и тропическо-низкобореальному видам. Однако эти водоросли по показателям как ферментативной, так и низкомолекулярной АОС примыкают к группе холодноводных видов (рис. 3В–Е). Полученные данные согласуются с результатами генетического анализа, согласно которому распространение *S. pallidum* и *G. divaricata* в субтропические/тропические воды произошло из северо-восточной Азии (Lee et al., 2009; Cho et al., 2012). Вероятно, вселение этих макрофитов в теплые широты происходит только в холодное время года, когда температура воды снижается до показателей, характерных для умеренных широт в летний период (Titlyanov et al., 2015). Данное предположение согласуется с результатами полевых экспериментов, выполненных на японской *G. divaricata*, в которых этот вид проявляет низкую устойчивость к аномальному повышению температуры воды до 26–27°C (Белоциценко, 2015).

Таким образом, на основании проведенных исследований можно заключить, что антиоксидантный потенциал верхнесублиторальных макроводорослей Японского моря отличается широкой таксономической и межвидовой вариабельностью. Максимальные активности и содержание компонентов универсальной АОС характерны для представителей зелёных водорослей (отдел Chlorophyta), а минимальные – для бурых (отдел Ochrophyta, класс Phaeophyceae). Не исключено, что межвидовые различия в активности АОС морских макроводорослей в пределах систематических отделов связаны с географическим происхождением и филогенетически закреплённой способностью видов к активации и синтезу антиоксидантных компонентов, что определяет адаптивные возможности водных растений противостоять окислительному стрессу в условиях флуктуаций факторов окружающей среды.

Необходимо отметить, что сведения о диапазоне вариабельности основных компонентов АОС массовых видов макроводорослей Японского моря представляют несомненный практический интерес. Принимая во внимание относительную чистоту акватории, в которой проведен сбор водорослей, полученные данные могут оказаться полезными для оценки функционального состояния растительных гидробионтов при биоиндикации и экологическом мониторинге прибрежных водных экосистем умеренных широт.

Авторы выражают благодарность А.В. Скрипцовой и Ю.В. Набивайло (Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН) за помощь при сборе водорослей и анализе биогенных элементов в воде.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Белоциценко Е.С. Устойчивость морских макроводорослей к фотоокислительному стрессу в условиях флуктуации температуры: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток. 2015. 26 с.
- Ли Б.Д. Разделение, идентификация и количественное определение фотосинтетических пигментов макробентосных водорослей // Экологические аспекты фотосинтеза морских макроводорослей. Владивосток: ДВНЦ АН СССР. 1978. С. 38–54.
- Ли Б.Д., Титлянов Э.А. Адаптация бентических растений к свету. III. Содержание фотосинтетических пигментов в морских макрофитах из различных по освещенности мест обитания // Биол. моря. 1978. № 2. С. 47–55.
- Перестенко Л.П. Водоросли залива Петра Великого. Л.: Наука. 1980. 232 с.
- Тарасов В.Г., Касьянов В.Л., Адрианов А.В. и др. Экологическое состояние и донные сообщества бухт Патрокл и Соболев (залив Петра Великого, Японское море): прошлое и настоящее // Вестн. ДВО РАН. 2005. № 1. С. 3–18.
- Ткаченко Ф.П., Ситникова Ю.А., Куцын Е.Б. Состояние элементов антиоксидантной системы водорослей из разных по степени загрязнения районов Черного моря // Экол. моря. 2004. Вып. 65. С. 70–74.
- Шахматова О.А., Мильчакова Н.А. Влияние экологических условий на активность каталазы массовых видов черноморских макроводорослей // Альгология. 2014. Т. 24, № 4. С. 461–476.
- Шутиков В.К., Розенберг Г.С. Рандомизация и бутстреп: статистический анализ в биологии и экологии с использованием R. Тольятти: Кассандра. 2013. 314 с.
- Abele D., Punarulo S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defense systems in polar and temperate marine invertebrates and fish // Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol. 2004. Vol. 138. P. 405–415.
- Aguilera J., Dummermuth A.L., Karsten U. et al. Enzymatic defense against photooxidative stress induced by ultraviolet radiation in Arctic marine macroalgae // Polar Biol. 2002. Vol. 25. P. 432–441.
- Aguilera J., Wiencke C., Dummermuth A.L. Biochemical properties of antioxidative enzymes and the effect of radiation conditions in marine macroalgae from Kongsfjorden and other regions // The coastal ecosystem of Kongsfjorden, Svalbard: Synopsis of biological research performed at the Koldewey Station in the years 1991–2003. Ber. Polarforsch. Meeresforsch. 2004. Vol. 492. P. 195–208.
- Alscher R.G., Erturk N., Heath L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants // J. Exp. Bot. 2002. Vol. 53. P. 1331–1341.
- Anderson M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples // Meth. Enzymol. 1985. Vol. 113. P. 548–555.
- Asada K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions // Plant Physiol. 2006. Vol. 141. P. 391–396.
- Beers R.F., Sizer I.W. A spectrophotometric method for measuring breakdown of hydrogen peroxide by catalase // J. Biol. Chem. 1952. Vol. 195. P. 133–140.
- Beyer W.F., Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions // Anal. Biochem. 1987. Vol. 161. P. 559–566.
- Bianchi T.S., Kautsky L., Argyrou M. Dominant chlorophylls and carotenoids in macroalgae of the Baltic Sea (Baltic proper): their use as potential biomarkers // Sarsia. 1997. Vol. 82. P. 55–62.
- Bischof K., Rautenberger R. Seaweed responses to environmental stress: reactive oxygen and antioxidative strategies // Ecol. Stud. 2012. Vol. 219. P. 109–132.
- Bradford E. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.
- Carvalho A., Neto A., Tonon A. et al. Circadian protection against oxidative stress in marine algae // Hypnos. 2004. Vol. 1, suppl. 1. P. 142–157.

- Chakraborty S., Santra S.C., Bhattacharya T. Seasonal variation of enzyme activity and stress metabolites in eight benthic macroalgae with fluctuations in salinity of Sunderban estuary, India // Indian J. Mar. Sci. 2010. Vol. 39, no. 3. P. 429–433.
- Cho S.M., Lee S.M., Ko Y.D. et al. Molecular systematic reassessment of *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae) in Korea using four gene regions // Bot. Mar. 2012. Vol. 55. P. 473–484.
- Choo K., Snoeijis P., Pedersen M.J. Oxidative stress tolerance in the filamentous alga *Cladophora glomerata* and *Enteromorpha ahlneriana* // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2004. Vol. 298. P. 111–123.
- Coba F., Aguilera J., Figueroa F.L. et al. Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated from three red macroalgae and one marine lichen // J. Appl. Phycol. 2009. Vol. 21. P. 161–169.
- Collen J., Davison I.R. Reactive oxygen metabolism in intertidal *Fucus* spp. (Phaeophyceae) // J. Phycol. 1999a. Vol. 35. P. 62–69.
- Collen J., Davison I.R. Stress tolerance and reactive oxygen metabolism in the intertidal red seaweeds *Mastocarpus stellatus* and *Chondrus crispus* // Plant, Cell Environ. 1999b. Vol. 22. P. 1143–1151.
- Connan S., Delisle F., Deslandes E., Gall E.A. Intra-thallus phlorotannin content and antioxidant activity in Phaeophyceae of temperate waters // Bot. Mar. 2006. Vol. 49. P. 39–46.
- Contreras L., Moenne A., Correa J.A. Antioxidant responses in *Scytosiphon lomentaria* (Phaeophyceae) inhabiting copper enriched coastal environments // J. Phycol. 2005. Vol. 41. P. 1184–1195.
- Engels N.M. Oxidative damage and antioxidant metabolism of *Ulva pertusa* and the associated grazer *Micrelenchus tenebrosus* in response to fluoranthene exposure // M. Sci. Thesis. Univ. of Otago. 2011. <http://hdl.handle.net/10523/1949>
- Flores-Molina M.R., Thomas D., Lovazzano C. et al. Desiccation stress in intertidal seaweeds: effects on morphology, antioxidant responses and photosynthetic performance // Aquat. Bot. 2014. Vol. 113. P. 90–99.
- Gillespie K.M., Ainsworth T.A. Measurement of reduced, oxidized and total ascorbate content in plants // Nat. Protoc. 2007. Vol. 2, no. 4. P. 871–874.
- Goldberg D.M., Spooner R.J. Glutathione reductase // Methods of enzymatic analysis. Weinheim: Verlag Chemie. 1983. Vol. 111. P. 258–265.
- Guiry, Guiry. 2016. www.algaebase.org. 05.09.2016
- Gylle A.M., Nygard C.A., Syan C.I. et al. Photosynthesis in relation to D1, PsA and Rubisco in marine and brackish water ecotypes of *Fucus vesiculosus* and *Fucus radicans* (Phaeophyceae) // Hydrobiologia. 2013. Vol. 700. P. 109–119.
- Jiao G., Yu G., Zhang J., Ewart H.S. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae // Mar. Drugs. 2011. Vol. 9. P. 196–223.
- Khan N.M., Mobin M., Abbas Z.K. Variation in photosynthetic pigments, antioxidant enzymes and osmolyte accumulation in seaweeds of Red Sea // Int. J. Plant Biol. Res. 2015. Vol. 3. P. 1028–1034.
- Lee J.I., Kim H.G., Geraldino P.J.L. et al. Molecular classification of the genus *Grateloupia* (Halymeniaceae, Rhodophyta) in Korea // Algae. 2009. Vol. 24, no. 4. P. 231–238.
- Lesser M.P. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology // Annu. Rev. Physiol. 2006. Vol. 68. P. 253–278.
- Lobban C.S., Harrison P.J. Seaweed ecology and physiology. New York: Cambridge Univ. Press. 1994. 366 p.
- Lohrmann N.L., Logan B.A., Jonson A.S. Seasonal acclimatization of antioxidants and photosynthesis in *Chondrus crispus* and *Mastocarpus stellatus*, two co-occurring red algae with differing stress tolerances // Biol. Bull. 2004. Vol. 207. P. 225–232.
- Mizuta H., Yasui H. Significance of radical oxygen production in sorus development and zoospore germination in *Saccharina japonica* (Phaeophyceae) // Bot. Mar. 2010. Vol. 53. P. 409–416.
- Munda I.M. Preliminary information on the ascorbic acid content in some Adriatic seaweeds // Hydrobiologia. 1987. Vol. 151/152. P. 477–481.
- Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts // Plant Cell Physiol. 1981. Vol. 22. P. 867–880.
- Park J.J., Han T., Choi E.M. Oxidative stress and antioxidant activities of intertidal macroalgae in Korea // J. Food Sci. Nutr. 2011. Vol. 16. P. 313–320.
- Pawlik-Skowronska B., Pirszel J., Brown M.T. Concentrations of phytochelators and glutathione found in natural assemblages of seaweeds depend on species and metal concentrations of the habitat // Aquat. Toxicol. 2007. Vol. 83. P. 190–199.
- Schiavon M., Morob I., Pilon-Smits E.A. et al. Accumulation of selenium in *Ulva* sp. and effects on morphology, ultrastructure and antioxidant enzymes and metabolites // Aquat. Toxicol. 2012. Vol. 122–123. P. 222–231.
- Telfer A., Dhami S., Bishop S.M. et al. β -Carotene quenches singlet oxygen formed by isolated photosystem II reaction centers // Biochemistry. 1994. Vol. 33. P. 14469–14474.
- Titlyanov E.A., Titlyanova T.V., Belous O.S. Checklist of the marine flora of Nha Trang Bay (Vietnam, South China Sea) and decadal changes in the species diversity composition between 1953 and 2010 // Bot. Mar. 2015. Vol. 58. P. 1–11.
- Wahid A., Gelani S., Ashraf M., Foolad M.R. Heat tolerance in plants: an overview // Environ. Exp. Bot. 2007. Vol. 61. P. 199–223.

Научный редактор **Н.И. Селин**
Редактор электронной верстки **С.В. Филатов**
Наборщик электронной верстки **Э.Ф. Масленникова**

Сдано в набор 10.07.2017 г. Подписано к печати ...2017 г. Формат бумаги 60x88¹/₈.
Офсетная печать. Усл.печ.л. . Уч.-изд.л. . Бум.л. . Тираж 120 экз. Заказ

Учредители: Президиум РАН и Дальневосточное отделение РАН

Издатель – ФГУП «Издательство "Наука"», 117997 Москва, Профсоюзная, 90.
ФГУП "Издательство Дальнаука"
690041, г. Владивосток, ул. Радио, 7.
Тел. 231-23-59. E-mail: dalnauka@mail.ru
[Http://www.dalnauka.ru](http://www.dalnauka.ru)
Отпечатано в ООО "ПОЛИГРАФ–СЕРВИС–ПЛЮС"
г. Владивосток, ул. Русская, 65, корпус 10

88-я пустая