

Том 50, Номер 3

ISSN 0134-3475

Май–Июнь 2024



БИОЛОГИЯ МОРЯ



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 50, номер 3, 2024

Обзор

Антивирусный потенциал полисахаридов морских бактерий

Т. А. Кузнецова, [Н. Н. Беседнова], Т. С. Запорожец, М. С. Кокоулин,
Ю. С. Хотимченко, М. Ю. Щелканов

179

Оригинальные статьи

Антиоксидантный комплекс черноморского двустворчатого моллюска *Flexopecten glaber ponticus* (Vucsoy, Dautzenberg et Dollfus, 1889) в естественных условиях обитания

О. Л. Гостюхина, Т. И. Андреевко

191

Эколого-биологические аспекты воздействия наночастиц и токсичных форм металлов на морские и условно-патогенные бактерии

И. А. Беленева, У. В. Харченко

203

Влияние вида и концентрации микроводорослей на рацион и продукцию яиц у копепод *Calanipeda aquaedulcis* Krichagin, 1873 и *Arctodiaptomus salinus* (Daday, 1885)

Л. О. Аганесова, А. Н. Ханайченко

217

Содержание тяжелых металлов в морской траве *Zostera marina* Linnaeus, 1753 в бухте Воевода (Амурский залив, Японское море)

А. А. Рюмина, П. Я. Тищенко, Е. М. Шкирникова, Ю. А. Барабанищikov

229

Краткие сообщения

Результаты трансектных наблюдений за морскими млекопитающими в Татарском проливе и на переходах в сопредельных акваториях осенью 2018 г.

П. А. Пермяков, С. Д. Рязанов

239

Нарушения гистологического строения печени обыкновенной кильки *Clupeonella caspia* Svetovidov, 1941 в условиях антропогенной нагрузки

Т. Х. В. Нгуен, М. П. Грушко, Н. Н. Федорова, В. А. Чаплыгин

245

Contents

Volume 50, No 3, 2024

Review

Antiviral Potential of Marine Bacteria Polysaccharides

*T. A. Kuznetsova, [N. N. Besednova], T. S. Zaporozhets, M. S. Kokoulin,
Yu. S. Khotimchenko, M. Yu. Shchelkanov*

179

Original papers

Antioxidant Complex of the Black Sea Bivalve *Flexopecten glaber ponticus*
(Bucquoy, Dautzenberg et Dollfus, 1889) in Natural Habitat

O. L. Gostyukhina, T. I. Andreenko

191

Ecological and Biological Aspects of Effect of Nanoparticles and Toxic Forms of Metals on Marine
and Opportunistic Bacteria

I. A. Beleneva, U. V. Kharchenko

203

Effect of Microalgae Species and Concentration on Grazing Rate and Egg Production
of Copepods *Calanipeda aquaedulcis* Kritschagin, 1873 and *Arctodiaptomus salinus* (Daday, 1885)

L. O. Aganesova, A. N. Khanaychenko

217

Heavy Metal Content in the Seagrass *Zostera marina* Linnaeus, 1753
in Voevoda Bay (Amur Bay, Sea of Japan)

A. A. Ryumina, P. Ya. Tishenko, E. M. Shkirnikova, Yu. A. Barabanshchikov

229

Brief notes

Results of Transect Observations of Marine Mammals in the Tatar Strait
and During Passages within Adjacent Water Areas in the Fall of 2018

P. A. Permyakov, S. D. Ryazanov

239

Structural Changes in Liver Histology in Common Kilka *Clupeonella caspia* Svetovidov,
1941 under Anthropogenic Pressure

T. H. V. Nguyen, M. P. Grushko, N. N. Fedorova, V. A. Chaplygin

245

УДК 574.6+615.331:561.232:577.114; 547.022:578.7

АНТИВИРУСНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ПОЛИСАХАРИДОВ МОРСКИХ БАКТЕРИЙ

© 2024 г. Т. А. Кузнецова^{1, *} (ORCID: 0000-0002-4315-6959),
Н. Н. Беседнова¹, Т. С. Запорожец¹ (ORCID: 0000-0002-8879-8496),
М. С. Кокоулин² (ORCID: 0000-0003-2245-6802),
Ю. С. Хотимченко^{3, 4} (ORCID: 0000-0002-6979-1934),
М. Ю. Щелканов^{1, 3, 4} (ORCID: 0000-0001-8610-7623)

¹НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток 690087, Россия

²Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова (ТИБОХ) ДВО РАН,
Владивосток 690022, Россия

³Дальневосточный федеральный университет (ДВФУ), Владивосток 690091, Россия

⁴Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского (ННЦМБ) ДВО РАН,
Владивосток 690041, Россия

*e-mail: takuznets@mail.ru

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После доработки 24.01.2024 г.

Принята к публикации 30.01.2024 г.

Интенсивные популяционные взаимодействия между элементами планктона и виروпланктона Мирового океана сформировали древние и одновременно универсальные механизмы защиты морских бактерий и архей от воздействия на них вирусов океана. Одним из таких механизмов являются экзополисахариды, которые секретируются морскими прокариотами с целью взаимодействия с поверхностными белками вирусных частиц и предотвращения связывания вирусных пепломеров с рецепторами потенциальных клеток-мишеней. Поэтому среди экзополисахаридов морских бактерий в большом количестве обнаруживают вещества с широким спектром действия, проявляющие противовирусный эффект и способность модулировать межклеточные взаимодействия. В обзоре проанализированы современные представления об экзополисахаридах морских бактерий, их противовирусном потенциале, антиоксидантной и иммуномодулирующей активности. Дана краткая характеристика структурных и физико-химических свойств таких соединений, раскрыты основные механизмы противовирусной активности наиболее известных представителей этого класса органических полимеров. Показано, что экзополисахариды морских бактерий являются перспективным и чрезвычайно богатым источником противовирусных лекарственных субстанций.

Ключевые слова: морские бактерии, вирусы Мирового океана, экзополисахариды, противовирусная активность, цитотоксичность, антиоксидантные свойства, иммуномодуляторы

DOI: 10.31857/S0134347524030012

На протяжении всей своей эволюции морские бактерии были вынуждены осуществлять конкуренцию не только с другими прокариотами из доменов Archaea и Bacteria, но и наиболее многочисленными в Мировом океане представителями домена Virae (Khotimchenko, Shchelkanov, 2024). На каждую прокариотическую клетку планктона приходится не менее сотни, а чаще десятки тысяч частиц виروпланктона (Nara et al.,

1991; Breitbart, 2012). Поэтому в процессе эволюции морские бактерии приобрели многочисленные механизмы противовирусной защиты как на уровне популяции, так и на уровне индивидуальной клетки. Одним из таких механизмов стали экзополисахариды (ЭПС) — углеводородные полимеры, секретируемые одноклеточными микроорганизмами, присутствующими на внешней поверхности клеточных стенок, в слизистом

чехле или в окружающей среде (Кузнецова и др., 2023; Bello-Morales et al., 2022).

Морские микроорганизмы, составляющие не менее половины первичной продукции органических веществ на нашей планете, постоянно присутствуют в морских экосистемах и могут быть изолированы из толщи воды, морских отложений, представителей морской флоры и фауны (Shyam et al., 2021). При этом ЭПС участвуют в молекулярном распознавании, передаче межклеточных сигналов, процессе адгезии микроорганизмов к различным поверхностям, защищают их от разнообразных физико-химических и биологических воздействий (Беседнова и др., 2022; Кузнецова и др., 2023) и сами способны модулировать действие метаболитов, регулирующих физиологические процессы в микробных популяциях (Vavilin et al., 2002).

ЭПС из морских бактерий привлекают к себе внимание ученых в качестве потенциального источника противовирусных лекарственных веществ, поскольку они в большинстве случаев нетоксичны или слабо токсичны, обладают антимикробным, противовоспалительным, антиоксидантным и иммуномодулирующим действием, что имеет значение для терапии вирусных инфекций, при которых окислительный стресс, системное воспаление и нарушения со стороны иммунной системы являются важными компонентами патогенеза. Особую ценность этим соединениям придает то, что они являются поливалентными биорегуляторами – биологически активными веществами (БАВ) с разнообразной ассоциированной активностью (Almutairi, Helal, 2021; Qi et al., 2022; Mishra et al., 2023).

Несмотря на очевидный прогресс в области контроля за вирусными инфекциями, для многих из них нет профилактических вакцин и эффективных методов медикаментозного лечения. В этой связи поиск новых противовирусных соединений сохраняет свою несомненную актуальность. Один из подходов к разработке противовирусных препаратов направлен на изучение вируса и идентификацию конкретного вирусного белка в качестве лекарственной мишени с целью ограничения его потенциальной токсичности и повышения эффективности препарата. Второй подход предполагает создание противовирусных препаратов широкого

спектра действия, которые нацелены на константные белки, принадлежащие различным вирусам или на универсальные клеточные процессы, протекающие в инфицированных клетках (Geraghty et al., 2021; Besednova et al., 2022).

Целью настоящей работы является обзор литературных источников последних лет, касающихся перспектив применения ЭПС из морских бактерий в качестве противовирусных средств.

Структурные и физико-химические характеристики ЭПС

В зависимости от локализации и функций полисахариды бактерий можно разделить на три группы: запасные (внутриклеточные), структурные (входящие в состав клеточных стенок) и внеклеточные (ЭПС) (Laroche, 2022).

Морские микробные полисахариды, особенно внеклеточные, отличаются структурным разнообразием и сложностью строения. Основной скелет этих биополимеров состоит из моносахаридных единиц, связанных между собой, как правило, О-гликозидными связями. Они могут быть подразделены на регулярные (из идентичных повторяющихся звеньев) и нерегулярные (из различных типов звеньев без выраженных закономерностей). Из полисахаридов второго типа можно выделить обширную группу соединений со скрытой регулярностью, которые образуются в живой клетке из регулярных молекул в результате химических модификаций, причем модифицированные звенья распределяются вдоль полимерной цепи либо в виде блоков произвольной длины, либо хаотически. С точки зрения компонентного состава, выделяют гомо- и гетерополисахариды. Первую группу составляют полисахариды, построенные из одного вида моносахаридных остатков (Wang et al., 2012; Barcelos et al., 2020).

Моносахаридный состав ЭПС чрезвычайно разнообразен и включает нейтральные сахара (пентозы, гексозы, гептозы и их производные), амино- и диаминосахара, уроновые кислоты (в том числе амино- и диаминоуроновые кислоты), дезокси- и дидезоксисахара, улозоновые кислоты и разветвленные моносахариды, как распространенные в природе, так и не найденные в других источниках. Кроме того, ЭПС

микроорганизмов часто содержат неуглеводные заместители: ацетильные, метильные, аминокислотные, глицерильные, пирувилльные, сукцинилльные, лактильные, фосфатные и сульфатные группы (Poli et al., 2010; Casillo et al., 2018). Природа, последовательность, аномальная конфигурация, тип связи и тип замещения индивидуальных моносахаридных остатков внутри повторяющейся единицы является характерным и уникальным для каждого полисахарида. Разнообразие компонентов и их связей делает возможным существование огромного количества структур полисахаридных цепей, которые всё чаще обнаруживают в природных соединениях.

Полимерная структура микробных ЭПС придает им свойства, которыми не обладают мономерные полисахариды. Благодаря их высокой молекулярной массе, динамическому радиусу и повторяющейся структуре полимеры могут быть скорректированы для регулирования их фармакодинамики и фармакокинетики – например, путём множественного присоединения лигандов, определяющих множественное связывание с рецепторами на поверхности клетки-мишени (Bianculli et al., 2020) или вирусной частицы (Беседнова и др., 2022). Это очень важное свойство, поскольку поливалентные взаимодействия намного сильнее, чем моновалентные.

По данным различных авторов, молекулярная масса ЭПС колеблется в пределах 10^4 – 10^6 Да (Almutairi, Helal, 2021); $(1-5) \times 10^5$ Да (García et al., 2022). Молекулярные массы гомополисахаридов, как правило, выше гетерополисахаридов – в среднем 10^7 Да vs. 10^4 – 10^6 Да (Panchal et al., 2022). В большинстве случаев ЭПС безопасны, стабильны при физиологических условиях, биосовместимы и биоразлагаемы (Moreira et al., 2022). Эти макромолекулы имеют сложные химические структуры в соответствии с каждым видом, обладают антиоксидантными, противовоспалительными, иммуномодулирующими, антимикробными и противоопухолевыми свойствами. Содержание полисахаридов в бактериальных клетках в зависимости от условий выращивания может достигать 50% сухой массы (Levasseur et al., 2020).

Цианобактерии (ЦБ) (прежнее название – сине-зеленые водоросли), составляющие

в домене Bacteria отдельный тип Cyanobacteria, представители которого способны к оксигенному фотосинтезу (и более того, являются древнейшими из известных фотосинтезирующих организмов), имеют некоторые структурные особенности ЭПС по сравнению с полимерами, продуцируемыми другими микроорганизмами, – например, наличие уроновых кислот и сульфатных групп (Babich et al., 2022).

В последнее время внимание ученых привлекают микроорганизмы-экстремофилы, обитающие в глубоководных зонах, гидротермальных жерлах, вулканических и гидротермальных морских районах, соленых линзах и морском льду полярных регионов. ЭПС экстремофилов часто выполняют не только противовирусную, но и средообразующую функцию вблизи продуцента (Merino et al., 2019; Zhu et al., 2020; Kochhar et al., 2022). В связи с этим можно ожидать получения из таких микроорганизмов ЭПС с уникальными физико-химическими свойствами.

Основной проблемой, связанной с коммерческим применением ЭПС из морских бактерий, на сегодняшний день является высокая стоимость их производства. Однако понятно, что использование бактерий для получения необходимых ЭПС позволяет в ближайшей перспективе применять автоматизированные реакторы, которые имеют известные преимущества: легкость контроля, отсутствие зависимости от сезонных погодных колебаний и климатических изменений, воспроизводимость полученных параметров, высокую степень стандартизации. Это позволяет использовать получаемые продукты в биомедицинском секторе, в том числе при производстве противовирусных препаратов, БАД и компонентов функциональных диетических продуктов (Kokoulin et al., 2021). В последние годы много работ посвящено оптимизации параметров ферментации для разработки крупномасштабного производства ряда этих соединений (García et al., 2022).

Для получения новых соединений (в том числе полисахаридов) предложено использовать выделение их из малоизвестных или неизученных видов, создание различных стрессовых условий при культивировании, ферментативную обработку известных молекул (Abu-Ghosh et al.,

2021). Все эти подходы можно определенным образом комбинировать.

Для усиления биологической активности ЭПС могут быть соответствующим образом модифицированы. Молекулярную массу можно снизить физическим воздействием (ультразвуковым или микроволновым) и/или с помощью специфических ферментов, разрушающих гликозидные связи. Химическая модификация ЭПС путем введения новых функциональных групп (сульфатирование, фосфорилирование, ацетилирование, селенирование) также влияет на их физико-химические свойства и биологическую активность, в том числе на противовирусную (Liu et al., 2023).

Антивирусные свойства и механизмы действия ЭПС морских бактерий

ЭПС морских бактерий обладают способностью ингибировать как оболочечные, так и безоболочечные вирусы, хотя конкретные соединения могут обладать избирательностью действия.

Недавно был выделен низкомолекулярный ЭПС, продуцируемый термостойкой грамположительной *Bacillus licheniformis* (Bacillales: Bacillaceae), содержащий остатки полиглутаминовой и тейхоевой кислот, и протестирована его способность ингибировать *in vitro* репродукцию *Simplexvirus humanalpha 1*¹ (Herpevirales: Herpesviridae), *Perhabdovirus perca* (Mononegavirales: Rhabdoviridae) и *Vesiculovirus indiana* (Mononegavirales: Rhabdoviridae), *Protoparvovirus rodent 1* (Piccovirales: Parvoviridae) (Sánchez-León et al., 2020). Данный ЭПС ингибировал проникновение в клетки оболочечных *S. humanalpha 1* и *V. indiana*. Оболочечный *Pe. perca* и безоболочечный *Pr. rodent 1* оказались нечувствительны к действию этого соединения. Обращает на себя внимание чрезвычайно низкий уровень токсичности ЭПС как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo* (на модели лабораторных мышей). Арена с соавторами (Arena

et al., 2006) исследовали антивирусное и иммуномодулирующее действие ЭПС *B. licheniformis*, выделенной из вод горячего источника в Италии. Данное соединение включало тетрасахаридное регулярно повторяющееся звено, состоящее из сахаров с маннозо-пиранозной структурой. В дозах 200 и 300 мкг/мл ЭПС значительно снижал титр *Simplexvirus humanalpha 2* (Herpevirales: Herpesviridae) в моноклеарных клетках периферической крови человека, для которых был практически нетоксичен, а также усиливал продукцию провоспалительных цитокинов IFN α , IFN γ , IL-12 и IL-18.

Антигерпетическая активность (на модели *S. humanalpha 2*) была показана при изучении ЭПС морской термофильной грамположительной бактерии *licheniformis* (Gugliandolo et al., 2014; Spano, Arena, 2016). В концентрации 300 мкг/мл степень подавления вирусной репродукции достигала 85% при увеличении продукции Th-1-цитокинов (TNF α , IFN γ , IFN α , IL-12 и IL-18). ЭПС может рассматриваться в качестве терапевтического средства у пациентов с герпесвирусной инфекцией, сопровождающейся ослабленным иммунитетом – например, на фоне инфекции *Lentivirus humanense 1* (Ortervirales: Retroviridae), когда стандартные терапевтические подходы малоэффективны (Папуашвили, Щелканов, 2004; Karamov et al., 1996).

Заметной противовирусной активностью в отношении *S. humanalpha 2* обладает ЭПС, продуцируемый грамотрицательными бактериями *Pseudoalteromonas* sp. (Alteromonadales: Pseudoalteromonadaceae), выделенными из красной морской губки *Haliclona* sp. (Haplosclerida: Chalinidae): ингибирование бляшкообразования после обработки равным объемом 10% ЭПС достигает 60% (Al-Nahas et al., 2011).

ЭПС бактерии-актиномицета *Streptomyces hissutus* (Streptomycetales: Streptomycetaceae) из морских осадков на северном побережье Египта, широко распространенной как на суше, так и в водной среде (Лямин и др., 2022), представляет собой гетерополисахарид (глюкуроновая кислота : галактуроновая кислота : глюкоза : манноза : арабиноза = 1.2 : 0.6 : 0.1 : 0.2 : 0.1) с молярной массой 4.25×10^5 г/моль и ковалентными β -связями без сульфатных групп. Он имеет 50% цитотоксическую концентрацию в культуре клеток Vero (эпителий почки африканской

¹ В 2021 г. Международный Комитет по таксономии вирусов объявил о переходе от собственных и смешанных названий вирусов к стандартной для биологии бинарной системе по принципу “род-вид” – см. подробности в работе (Khotimchenko, Shchelkanov, 2024). В настоящей работе мы будем использовать бинарные названия, но приводить в сносах прежние названия вирусов (Руководство, 2013).

зеленой мартышки), равную 387 мкг/мл, и практически не проявляет токсичности вплоть до 125 мкг/мл. При этом вблизи верхнего уровня нетоксичности этот ЭПС подавляет уровень репродукции *S. humanalpha 1*, *Hepatitis A* (Picornavirales: Picornaviridae) и *Enterovirus B* (Picornavirales: Picornaviridae) на 84.9%, 20.3% и 45.4%, соответственно. Авторы полагают, что в связи с высоким содержанием глюкуроновой и галактуроновой кислот ЭПС может блокировать рецепторы на поверхности вирусной частицы, что предотвращает рецептор-опосредованную адсорбцию на поверхности потенциальной клетки-мишени (El Awady et al., 2019).

ЭПС из морских бактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens* (Alteromonadales: Pseudoalteromonadales) проявил себя как протективное, противовирусное и иммунокорректирующее средство в терапии инфекции, вызванной *Orthoflavivirus encephalitidis* (Amarillovirales: Flaviviridae). В условиях эксперимента этот ЭПС был нетоксичным, способным ингибировать репликацию вируса в клетках линии СПЭВ (клетки почки эмбриона свиньи) и моноцитах периферической крови человека. Полисахарид снижал количество инфицированных клеток и уровень вирусной нагрузки, проявлял выраженный вирулицидный эффект. Индекс селективности (отношение 50% эффективной дозы препарата к его 50% цитотоксической дозе) для ЭПС превышает 40. При внесении полисахарида в образцы цельной крови, инфицированной *O. encephalitidis*, восстанавливалось индуцированное вирусом снижение экспрессии клеточных маркеров CD69, HLA-DR и CD107a на поверхности моноцитов, NK и CD8⁺ Т-клеток и продукция иммунокомпетентными клетками провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, IL-8, IFN α , IFN γ) (Крылова и др., 2019).

Таким образом, микробные ЭПС, как и полисахариды из других природных источников, могут оказывать свое противовирусное действие локально или системно. Они могут инaktivировать вирусы, ингибировать адсорбцию, проникновение или репликацию вирусов. При локальном способе воздействия ЭПС напрямую взаимодействуют либо с вирусами, либо с рецепторами на клетке-хозяине, в результате чего ускоряется процесс элиминации возбудителя. При системном действии микробные

ЭПС стимулируют врожденный и адаптивный иммунитет, оказывают антиоксидантное и противовоспалительное действие или подавляют ферменты репликации вируса (Saadat et al., 2019). Большинство изученных к настоящему времени ЭПС из морских бактерий воздействуют на вирусные инфекции, препятствуя прикреплению вирусов к клеткам. ЭПС могут производиться в больших масштабах в контролируемых условиях и могут быть альтернативой для лечения и профилактики вирусных инфекций.

Особый интерес исследователей вызывают ЭПС, продуцируемые ЦБ, поскольку древность этой группы бактерий подразумевает наличие развитых средств противовирусной защиты, имеющих важное значение в процессе популяционных взаимодействий планктона и вириопланктона (Khotimchenko, Shchelkanov, 2024). В частности, богатым источником ЭПС являются морские ЦБ *Arthrospira platensis* и *A. maxima* (Oscillatoriales: Microcoleales)². В последнее время эти ЭПС стали активно использоваться в фармацевтической промышленности, поскольку они обладают ингибирующим действием по отношению ко многим оболочечным вирусам, а также характеризуются высокой противовоспалительной, антиоксидантной и иммуномодулирующей активностью (Беседнова и др., 2022). При этом экстракты спирулины, полученные с помощью различных методов, могут различаться по своей вирусингибирующей активности.

ЭПС из различных видов спирулины показали широкий спектр противовирусной активности, например, в отношении *Orthopoxvirus cowpoxense* (Chitovirales: Poxviridae), *Orthopoxvirus ectromelia* (Chitovirales: Poxviridae), *S. humanalpha 1, 2*, *Cytomegalovirus humanbeta 5* (Herpesvirales, Orthoherpesviridae), *Morbillivirus hominis* (Mononegavirales: Paramyxoviridae), *Orthorubulavirus parotitidis* (Mononegavirales: Paramyxoviridae), *Alphainfluenzavirus influenzae* (Articulavirales: Orthomyxoviridae) (Singab et al., 2018), *Betacoronavirus sarsense 2* (Nidovirales: Coronaviridae), *Enterovirus A* (Picornavirales: Picornaviridae), *Orthopneumovirus hominis* (Mononegavirales: Pneumoviridae), *Orthoebolavirus*

² В русском языке за представителя рода *Arthrospira* закрепилось название “спирулина”.

zairense (Mononegavirales: Filoviridae) (Chen et al., 2021), *Cyivirus cyprinidallo 3* (Herpesvirales: Alloherpesviridae) (Reichert et al., 2017; Bergmann et al., 2022).

Чен с соавторами (Chen et al., 2016) экспериментально определили, что активные соединения, ответственные за противогриппозную активность холодноводного экстракта спирулины, представляют собой высокомолекулярные соединения (> 100 кДа), термолабильные и отрицательно заряженные полисахариды, в том числе сульфатированный полисахарид кальций-спирулан. В холодноводном экстракте спирулины содержалось $39.3 \pm 5.6\%$ белка, $11.8 \pm 5.7\%$ полисахаридов, $19.3 \pm 2.7\%$ нуклеиновых кислот, $5.0 \pm 1.0\%$ воды, $1.2 \pm 0.3\%$ золы и 23.4% других или неизвестных компонентов. Авторы полагают, что в тандеме с полисахаридом в данном случае может действовать фикоцианин, находящийся в экстракте, который подавляет экспрессию воспалительных факторов iNOS и COX-2 в макрофагах или легочной ткани, что было показано в экспериментах *in silico* (Pendyala, Patras, 2020). Фикоцианобилин, полученный из спирулины, имеет более высокую аффинность связывания с *B. sarsense 2* (Petit et al., 2021) по сравнению с известными лекарственными препаратами, такими как ремдесивир, лопинавир и нелфинавир, успешно зарекомендовавшими себя в терапии COVID-19 (Щелканов и др., 2020).

Холодноводный экстракт спирулины на 90% ингибировал проникновение псевдовиральных частиц бетакоронавирусов в клетки-мишени, прикрепляясь к S-белкам вирусных пепломеров, но не к поверхности клетки (Karthika et al., 2020). Для подтверждения факта, что ингибирующая активность не была связана с протеолитическим расщеплением S-белков в составе пепломеров, авторы инкубировали этот белок с экстрактом спирулины в течение 90 мин, а затем белок анализировали с помощью вестерн-блоттинга. Вместе с тем S-белки, инкубированные с экстрактом спирулины, не ингибировали взаимодействие первой субъединицы S-белка с рецептором ACE2, что свидетельствует о блокировании полисахаридом рецептор-связывающего сайта.

На чувствительность к холодноводному экстракту спирулины были исследованы различные

штаммы *A. influenzae*, в том числе устойчивые к озельтамивиру. При добавлении экстракта спирулины к инфицированным вирусом клеткам MDCK (эпителий почки собаки) отмечено зависимое от дозы снижение числа бляшек на 12.1% (0.38 мг/мл), 22.9% (0.75 мг/мл), 58.7% (1.50 мг/мл) и 89.0% (3.00 мг/мл). При этом 50% эффективная концентрация экстракта для пандемического штамма *A. influenzae* A/TW/126/2009 (H1N1pdm09) составила 0.59 ± 0.02 мг/мл. Авторы предполагают, что мишенью для спирулины является гемагглютинин (Chen et al., 2016). Это позволяет рассматривать холодноводные экстракты спирулины как потенциальные препараты для преодоления лекарственной устойчивости возбудителей гриппа, что чрезвычайно актуально для терапии этого инфекционного заболевания (Колобухина и др., 2011).

Клинические исследования с участием добровольцев (здоровые мужчины) показали, что под влиянием ежедневного приема экстракта спирулины в дозе 50 мг в крови пациентов усиливалась продукция IFN γ и функциональная активность NK-клеток (Hirahashi et al., 2002). По другим данным, у пациентов с ринитом после перорального приема таблеток, содержащих экстракт спирулины, наблюдали значительное купирование симптомов заболевания (Cingi et al., 2008). При исследовании острой и подострой токсичности в экспериментах *in vivo* на крысах линии Sprague-Dawley было установлено, что экстракт спирулины может оказывать терапевтический эффект в ещё меньших дозах. Механизм действия экстракта спирулины был связан с нарушением процесса проникновения вируса или предотвращения репликации возбудителя в клетках хозяина (Chen et al., 2016). Показано, что экстракты спирулины даже после пребывания на открытом воздухе в течение 4 ч не теряют своей противовирусной активности, что позволило авторам рекомендовать его местное применение в форме спрея (Chen et al., 2021).

Экстракт *Arthrospira maxima*, полученный из микроводорослей обработкой горячей водой, содержащий 42% полисахарида, 6% белка, 20% нуклеиновых кислот и 11% золы, подавлял образование бляшек штамма *Enterovirus A* (EV-71)/TW/4643/1998 при добавлении на стадии прикрепления вируса к клеткам-мишеням (Chen et al., 2021).

Экспериментальные данные продемонстрировали противовирусное действие ЭПС *A. platensis* по отношению к *Cyprinus cyprinidallo 3*: в концентрации 18 мкг/мл этот полисахарид практически полностью подавлял репликацию вируса в клетках культуры мозга сазана даже через 22 сут после заражения (Reichert et al., 2017; Bergmann et al., 2022). В экспериментах *in vivo* удавалось полностью подавить инфекционный процесс у обыкновенных карпов *Cyprinus carpio*, получавших ЭПС в двойной концентрации в течение 6 нед. профилактически (Bergmann et al., 2022).

ЭПС морских бактерий могут ускорять элиминацию возбудителя из организма, взаимодействуя с дендритными клетками и макрофагами, стимулируя пролиферацию Т- и В-лимфоцитов, НК-клеток и выработку про- и противовоспалительных цитокинов, а также улучшая выработку антител и усиливая фагоцитарную активность мононуклеаров периферической крови (Salimi, Farrokh, 2023). Вирусная инфекция индуцирует противовирусные иммунные реакции в клетках-хозяевах, первой линией защиты из которых является система интерферонов первого типа. ЭПС способны активировать НК-клетки, которые неспецифически уничтожают инфицированные клетки с помощью перфоринов и гранзимов (Van Erp et al., 2019).

Обнаружена высокая противовоспалительная активность нового ЭПС из бактерии *Kocuria* sp. (Micrococcales: Micrococcaceae), который в значительной степени нивелировал действие провоспалительных 5-LOX (Alshawwa et al., 2022).

Иммуномодулирующее действие ЭПС, выделенных из ЦБ, описано многими авторами (Chen et al., 2016; Riccio et al., 2020; Nigam et al., 2022). Эти соединения усиливают иммунный ответ, активируя функции макрофагов, продукцию провоспалительных интерлейкинов и фагоцитоз, особенно при первичном ответе (Anvar, Nowruz, 2021). Из *S. platensis* получен экстракт, представленный на фармацевтическом рынке как “Иммулина”, который является сильным активатором иммунных клеток. Иммулина проявляет защитный эффект при гриппе, активируя сигнальный путь NF-κB через рецептор TLR2 (Appel et al., 2018).

В последние десятилетия появились публикации о высоком антиоксидантном потенциале

ЭПС морских бактерий (Shyam et al., 2021; Qi et al., 2022), что открывает перспективы их использования и в этом направлении (Hassan, Hassan, 2017). На примере ЭПС *B. subtilis*, состоящего из рамнозы и мальтозы, показано одновременное антивирусное и антиоксидантное действие этого соединения (Hassan, Hassan, 2017). Полисахарид блокировал прикрепление и проникновение *S. humanalpha 1* в клетки в дозе 500 мкг/мл. С увеличением концентрации соединения возрастала и его антиоксидантная активность, более высокая, чем активность аскорбиновой кислоты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на успехи в области разработки вакцин для профилактики заболеваний, связанных с вирусами, лекарственные препараты продолжают занимать достойное место в арсенале современной медицины. Это связано с тем, что вакцины не защищают от заражения (они защищают от летальных исходов и тяжелых осложнений), а заболевания все равно часто требуют медикаментозного лечения, особенно в группах риска (Шелканов и др., 2010; Колобухина и др., 2011). Кроме того, далеко не все вирусные инфекции в настоящее время являются вакциноуправляемыми (Руководство, 2013; Karamov et al., 1996), а благодаря высокому уровню генетической изменчивости вирусы быстро приобретают мутации, определяющие устойчивость к применяемым препаратам (Колобухина и др., 2010; Бреслав и др., 2013). Поэтому поиск новых соединений, обладающих широким спектром противовирусной активности, не теряет своей актуальности (Беседнова и др., 2022; Besednova et al., 2021, 2022).

Морские бактерии на протяжении сотен миллионов лет своей эволюции были вынуждены постоянно совершенствовать универсальные механизмы противостояния виропланктону, который является наиболее многочисленным сообществом живых организмов на нашей планете (Khotimchenko, Shchelkanov, 2024). Морская группа домена Bacteria продуцирует колоссальное разнообразие ЭПС с уникальными характеристиками, которые в перспективе могли бы воспроизводиться в необходимом количестве при должном контроле их качества. Человечество только приступило к изучению этого класса природных органических

соединений. Однако уже сегодня понятно, что универсальность противовирусного действия ЭПС морских бактерий часто сочетается с разнообразными физиологическими эффектами, важнейшими из которых, с точки зрения терапии вирусных инфекций, являются антиоксидантная и иммуномодулирующая активности. Для усиления этих эффектов могут применяться физические, химические или биологические модификации. Применение подобных методов позволяет получить полисахариды или их сочетания, которые не способствуют формированию у вирусов лекарственной устойчивости. По-видимому, необходимо активнее проводить поиск комбинаций ЭПС морских бактерий с апробированными терапевтическими препаратами, что позволит усиливать лечебный эффект и уменьшать дозы реактогенных и токсичных препаратов.

Долгое время невысокая биодоступность полисахаридов после перорального введения вызывала разочарование у исследователей. Однако это препятствие можно преодолеть с помощью других стратегий введения препаратов, таких, например, как использование аэрозолей (Bello-Morales et al., 2022; Andreu et al., 2023). Кроме того, новые стратегии введения можно сочетать с современными системами доставки химических препаратов (наночастицами, липосомами, липофильными производными лекарств) в виде добавок в пищевые продукты в качестве анти-вирусных средств (Ratha et al., 2021) и иммуномодуляторов (Khavari et al., 2021) для разработки на их основе терапевтически эффективных противовирусных препаратов (Rosales-Mendoza et al., 2020).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках темы НИР № 122041800135-3 “Молекулярно-генетические и фенотипические свойства возбудителей респираторных инфекций. Поиск эффективных соединений из наземной и морской биоты Дальнего Востока для разработки средств профилактики и лечения” на 2022–2025 годы.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Беседнова Н.Н., Андрюков Б.Г., Запорожец Т.С. и др.* Оболочечные вирусы – патогенетическая мишень лектинов цианобактерий // Антибиотики и химиотерапия. 2022. Т. 67. № 5–6. С. 39–60.
- Бреслав Н.В., Шевченко Е.С., Абрамов Д.Д. и др.* Эффективность применения антинейраминидазных химиопрепаратов во время пандемии гриппа и в постпандемический период // Вопр. вирусологии. 2013. Т. 58. № 1. С. 28–32.
- Колобухина Л.В., Меркулова Л.Н., Малышев Н.А. и др.* Стратегия ранней противовирусной терапии при гриппе как профилактика тяжелых осложнений // Пульмонология. 2010. № 1. С. 9–14.
- Колобухина Л.В., Меркулова Л.Н., Щелканов М.Ю. и др.* Пандемический грипп в России: отличительные особенности клинического течения и отсутствие ранней этиотропной терапии как фактор риска развития тяжелых форм заболевания // Терапевтический архив. 2011. Т. 83. № 9. С. 48–53.
- Крылова Н.В., Смолина Т.П., Берлизова М.В., Леонова Г.Н.* Иммунокорректирующая и противовирусная активность полисахарида из морских бактерий в отношении вируса клещевого энцефалита // Антибиотики и химиотерапия. 2019. Вып. 64. № 11–12. С. 16–24.
- Кузнецова Т.А., Запорожец Т.С., Ермакова С.П. и др.* Адьюванты на основе полисахаридов из гидробионтов Тихого океана. Владивосток: Дальнаука. 2023.
- Лямин А.В., Терещенко В.С., Жестков А.В., Исмагуллин Д.Д.* Видовое разнообразие представителей рода *Streptomyces*, выделенных из клинического материала // Инфекция и иммунитет. 2022. Вып. 12. № 2. С. 386–390. doi: 10.15789/2220-7619-SDA-1838
- Папуашвили М.Н., Щелканов М.Ю.* Эффективность комбинированной терапии герпесвирусных инфекций у ВИЧ-инфицированных пациентов // Вопр. вирусологии. 2004. Т. 49. № 2. С. 25–29.
- Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. М.: МИА. 2013.
- Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Бургасова О.А. и др.* COVID-19: этиология, клиника, лечение // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10. № 3. С. 421–445.

- Щелканов М.Ю., Львов Д.Н., Федякина И.Т. и др. Динамика распространения пандемического гриппа А/Н1N1 sw1 на Дальнем Востоке в 2009 г. // *Вопр. вирусологии*. 2010. Т. 55. № 3. С. 10–15.
- Abu-Ghosh S.A., Dubinsky Z., Verdelho V. Unconventional high-value products from microalgae: A review // *Bioresour. Technol.* 2021. V. 329. Art. ID 124895. doi: 10.1016/j.biortech.2021.124895
- Almutairi M.H., Helal M.M.I. Exopolysaccharide production from isolated *Enterobacter sp.* strain ACD₂ from the northwest of Saudi Arabia // *J. King Saud Univ. Sci.* 2021. V. 33. № 2. Art. ID 101318. doi: 10.1016/j.jksus.2020.101318
- Al-Nahas M.O., Darwish M.M., Ali A.E., Amin M.A. Characterization of an exopolysaccharide-producing marine bacterium, isolate *Pseudoalteromonas sp.* // *Afr. J. Microbiol. Res.* 2011. V. 5. № 22. P. 3823–3831. doi 10.5897/AJMR11.757
- Alshawwa S.Z., Alshallash K.S., Ghareeb A. et al. Assessment of pharmacological potential of novel exopolysaccharide isolated from marine *Kocuria sp.* strain AG5: Broad-spectrum biological investigations // *Life*. 2022. V. 12. № 9. Art. ID 1387. doi: 10.3390/life12091387
- Andreu S., Kobbe C., Delgado P., Ripa I. Dextran sulfate from *Leuconostoc mesenteroides* B512F exerts potent antiviral activity against SARS-CoV-2 *in vitro* and *in vivo* // *Front Microbiol.* 2023. V. 14. Art. ID 1185504. doi: 10.3389/fmicb.2023.1185504
- Anwar A.A., Nowruzi B. Bioactive peptides of *Spirulina*: A review // *Microb. Bioact.* 2021. V. 4. № 1. P. 134–142. doi: 10.25163/microbbioacts.412117BO719110521
- Appel K., Munoz E., Navarrete C. et al. Immunomodulatory and inhibitory effect of Immulina, and Immunoges in the Ig-E mediated activation of RBL-2H3 cells. A new role in allergic inflammatory responses // *Plants*. 2018. V. 7. № 1. Art. ID 13. doi: 10.3390/plants7010013
- Arena A., Maugeri T.L., Pavone B. et al. Antiviral and immunoregulatory effect5 of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis* // *Int. Immunopharmacol.* 2006. V. 6. № 1. P. 8–13. doi: 10.1016/j.intimp.2005.07.004
- Babich O., Sukhikh S., Larina V. et al. Algae: study of edible and biologically active fractions, their properties and applications // *Plants*. 2022. V. 11. № 16. Art. ID 780. doi: 10.3390/plants11060780.
- Barcelos M.C.S., Vespermann K.A.C., Pelissari F.M., Molina G. Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides // *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2020. V. 60. P. 1475–1495. doi: 10.1080/10408398.2019.1575791
- Bello-Morales R., Andreu S., Ruiz-Carpio V. et al. Extracellular polymeric substances: still promising antivirals // *Viruses*. 2022. V. 14. № 6. Art. ID 1337. doi: 10.3390/v14061337
- Bergmann S.M., Reichert M., Hwang J. et al. The application of exopolysaccharides (EPS) can prevent viral disease of fish // *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 2022. V. 42. № 1. P. 15–27. doi: 10.48045/001c.38087
- Besednova N.N., Andryukov B.G., Kuznetsova T.A. et al. Antiviral effects and mechanisms of action of water extracts and polysaccharides of microalgae and cyanobacteria // *J. Pharm. Nutr. Sci.* 2022. V. 12. P. 54–73. doi: 10.29169/1927-5951.2022.12.05
- Besednova N.N., Andryukov B.G., Zaporozhets T.S. et al. Antiviral effects of polyphenols from marine algae // *Biomedicines*. 2021. V. 9. № 2. Art. ID 200. doi: 10.3390/biomedicines9020200
- Bianculli R.H., Mase J.D., Schulz M.D. Antiviral polymers: past approaches and future possibilities // *Macromolecules*. 2020. V. 53. P. 9158–9186. doi: 10.1021/acs.macromol.0c01273
- Breitbart M. Marine viruses: truth or dare // *Annu. Rev. Mar. Sci.* 2012. V. 4. P. 425–448. doi: 10.1146/annurev-marine-120709-142805
- Casillo A., Lanzetta R., Parrilli M., Corsaro M.M. Exopolysaccharides from marine and marine extremophilic bacteria: structures, properties, ecological roles and applications // *Mar. Drugs*. 2018. V. 16. № 2. Art. ID 69. doi: 10.3390/md16020069
- Chen Y.-H., Chang G.-K., Kuo S.-M. et al. Well tolerated *Spirulina* extract inhibits influenza virus replication and reduces virus-induced mortality // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. Art. ID 24253. doi: 10.1038/srep2453
- Chen Y.-H., Liao Y.-C., Huang J.-Y. et al. Hot water extract of *Arthrospira maxima* (AHWE) has broad-spectrum antiviral activity against RNA virus including coronavirus SARS-CoV-2 and the antiviral spray application // *Preprint of Far East Bio-Tec Co., Ltd. Taipei, Taiwan.* 2021. doi 10.1101/2021.06.06.446935
- Cingi J., Conk-Dalay S., Cakli H., Bal C. The effect of *Spirulina* on allergic rhinitis // *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laringol.* 2008. V. 265. № 10. P. 1219–1223. doi: 10.1007/s00405-008-0642-8
- El Awady M.E., Eldin M.A.N., Ibrahim H.M. et al. In vitro evaluation of antioxidant, anticancer, and antiviral activities of exopolysaccharide from *Streptomyces hirsutus* NRC2018 // *J. Appl. Pharm. Sci.* 2019. V. 9. № 11. P. 10–18. doi: 10.7324/JAPS.2019.91102

- García A., Fernandez-Sandoval M.T., Morales-Guzman D. et al.* Advances in exopolysaccharide production from marine bacteria // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2022. V. 97. № 10. P. 2694–2705. doi: 10.1002/jctb.7156
- Geraghty R.J., Aliota M.T., Bonnac L.F.* Broad-spectrum antiviral strategies and nucleoside analogues // *Viruses.* 2021. V. 13. Art. ID 4. P. 667. doi: 10.3390/v13040667
- Gugliandolo C., Spano A., Lentini V. et al.* Antiviral and immunomodulatory effects of a novel bacterial exopolysaccharide of shallow marine vent origin // *J. Appl. Microbiol.* 2014. V. 6. № 4. P. 1028–1034. doi: 10.1111/jam.12422
- Hara S., Terauchi K., Koike I.* Abundance of viruses in marine waters: assessment by epifluorescence and transmission electron microscopy // *Appl. Environ. Microbiol.* 1991. V. 57. № 9. P. 2731–2734. doi: 10.1128/aem.57.9.2731-2734.1991
- Hassan S.W.M., Hassan A.H.I.* Production, characterization and valuable applications of exopolysaccharides from marine *Bacillus subtilis* SH₁ // *Pol. J. Microbiol.* 2017. V. 66. № 4. P. 449–461. doi: 10.5604/01.3001.0010.7001
- Hirahashi T., Matsumoto M., Hazeki K. et al.* Activation of the human innate immune system by spirulina: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis* // *Int. Immunopharmacol.* 2002. V. 2. № 4. P. 423–434. doi: 10.1016/s1567-5769(01)00166-7
- Karamov E.V., Yaroslavtseva N.G., Shchelkanov M.Yu. et al.* Antigenic and genetic relations between different HIV-1 subtypes in Russia // *Immunol. Infect. Dis.* 1996. V. 6. P. 15–24. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:91155126>
- Karthika T., Joseph J., Akshay V.R. et al.* SARS-CoV-2 Cellular Entry Is Independent of the ACE2 Cytoplasmic Domain Signaling // *Cells.* 2021. V. 10. № 7. Art. ID 1814. DOI: 10.3390/cells10071814
- Khavari F., Saidijam M., Taheri M., Nouri F.* Microalgae: therapeutic potentials and applications // *Mol. Biol. Rep.* 2021. V. 48(5). P. 4757–4765. DOI: 10.1007/s11033-021-06422-w
- Khotimchenko Yu.S., Shchelkanov M.Yu.* Viruses of the Ocean: On the Shores of the Aqua Incognita. Horizons of the Taxonomic Diversity // *R. J. Mar. Biol.* 2024. V. 50. № 1. P. 3–30.
- Kochhar N., Kavya I.K., Shrivastava S. et al.* Perspectives on the microorganism of extreme environments and their applications // *Curr. Res. Microb. Sci.* 2022. V. 3. Art. ID 100134. doi: 10.1016/j.crmicr.2022.100134
- Kokoulin M.S., Romanenko L.A., Kuzmich A.S., Chernikov O.* Structure of the cell-wall-associated polysaccharides from the deep-sea marine bacterium *Devosia submarina* KMM9415T // *Mar. Drugs.* 2021. V. 19. № 12. Art. ID 665. doi: 10.3390/md19120665
- Laroche C.* Exopolysaccharides from microalgae and cyanobacteria: diversity of strains, production strategies, and application // *Mar. Drugs.* 2022. V. 20. № 5. Art. ID 336. DOI: 10.3390/md20050336
- Levasseur W., Perré P., Pozzobon V.* A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification // *Biotechnol. Adv.* 2020. V. 41. Art. ID 107545. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107545
- Liu T., Ren Q., Wang S. et al.* Chemical modification of polysaccharides: a review of synthetic approaches, biological activity and the structure-activity relationship // *Molecules.* 2023. V. 28. № 16. Art. ID 6073. doi: 10.3390/molecules28166073
- Merino N., Aronsdon H.S., Bojanova D.P., Feyhl-Buska J.* Living at the extremes: extremophiles and the limits of life in a planetary context // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. Art. ID 780. doi: 10.3389/fmicb.2019.00780
- Mishra N., Gupta E., Walag A.M.P. et al.* A review of marine natural product resources with potential bioactivity against SARS-CoV-2 // *Trop. J. Nat. Prod. Res.* 2023. V. 7. № 1. P. 2093–2103. doi: 10.26538/tjnpr/v7i1.2
- Moreira J.B., Vaz B.S., Cardias B.B. et al.* Microalgae polysaccharides: an alternative source for food production and sustainable agriculture // *Polysaccharides.* 2022. V. 3. P. 441–457. doi: 10.3390/polysaccharides3020027
- Nigam S., Singh R., Bhardwaj S.K. et al.* Perspective on the therapeutic applications of algal polysaccharides // *J. Polym. Environ.* 2022. V. 30. P. 785–809. DOI: 10.1007/s10924-021-02231-1
- Panchal R., Prajapati K., Prajapati M. et al.* Bacterial exopolysaccharides: types, its biosynthesis and their application in different Fields // *Acta Sci. Biotechnol.* 2022. V. 3. № 2. P. 3–11.
- Pendyala B., Patras A.* In silico screening of food bioactive compounds to predict potential inhibitors of COVID-19 main protease (M^{pro}) and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) // Preprint of Department of Agricultural and Environmental Sciences, Tennessee State University. Nashville, USA. 2020. P. 1–11.

- doi 10.26434/chemrxiv.12051927.v2
- Petit L., Vernes L., Cadoret J.P.* Docking and *in silico* toxicity assessment of *Arthrospira* compounds as potential antiviral agents against SARS-CoV-2 // *J. Appl. Phycol.* 2021. V. 33. № 3. P. 1579–1602. doi: 10.1007/s10811-021-02372-9
- Poli A., Anzelmo G., Nicolaus B.* Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities // *Mar. Drugs.* 2010. V. 8. № 6. P. 1779–1802. doi: 10.3390/md8061779
- Qi M., Zheng C., Wu W. et al.* Exopolysaccharides from marine microbes: source, structure and application // *Mar. Drugs.* 2022. V. 20. № 8. Art. ID 512. doi: 10.3390/md20080512
- Ratha S.K., Renuka N., Rawat M. et al.* Prospective options of algae derived nutraceuticals as supplements to combat COVID-19 and human coronavirus diseases // *Nutrition.* 2021. V. 83. Art. ID 111089. doi: 10.1016/j.nut2020.111089
- Reichert M., Bergmann S., Lindenberger C. et al.* Antiviral activity of exopolysaccharides from *Arthrospira platensis* against koi herpesvirus // *J. Fish Dis.* 2017. V. 40. № 10. P. 1441–1450. doi: 10.1111/jfd.12618
- Riccio G., Ruocco N., Mutalipassi M. et al.* Ten-Year research update review: antiviral activities from marine organisms // *Biomolecules.* 2020. V. 10. № 7. Art. ID 1007. doi: 10.3390/biom10071007
- Rosales-Mendoza I., García-Silva O., González-Ortega O. et al.* The potential of algal biotechnology to produce antiviral compounds and biopharmaceuticals // *Molecules.* 2020. V. 25. Art. ID 4049. doi: 10.3390/molecules25184049
- Saadat Y.R., Khosroushahi A.Y., Gargari B.P.* A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides // *Carbohydr. Polym.* 2019. V. 217. P. 79–89. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.04.025
- Salimi F., Farrokh P.* Recent advances in the biological activities of microbial exopolysaccharides // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2023. V. 39. Art. ID 213. doi: 10.1007/s11274-023-03660
- Shyam P.P., Rajkumar P., Ramya V. et al.* Exopolysaccharide production by optimized medium using novel marine *Enterobacter cloacae* MBB8 isolate and its antioxidant potential // *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.* 2021. V. 2. № 25. Art. ID 100070. DOI: 10.1016/j.carpta.2021.100070
- Spano A., Arena A.* Bacterial exopolysaccharide of shallow marine vent origin as agent in counteracting immune disorders induced by herpes virus // *J. Immunoassay Immunochem.* 2016. V. 37. № 3. P. 251–260. doi: 10.1080/15321819.2015.1126602
- Van Erp E.A., van Kampen M.R., van Kasteren P.B., de Wit J.* Viral infection of human natural killer cells // *Viruses.* 2019. V. 11. № 3. Art. ID 243. doi: 10.3390/v11030243
- Vavilin V.A., Shchelkanov M.Yu., Lokshina L.Y. et al.* A comparative analysis of a balance between the rates of polymer hydrolysis and acetoclastic methanogenesis during anaerobic digestion of solid waste // *Water Sci. Technol.* 2002. V. 45. № 10. P. 249–254. doi: 10.2166/wst.2002.0345
- Wang W., Wang Sh.-X., Guan H.-S.* The antiviral activities and mechanisms of marine polysaccharides: an overview // *Mar. Drugs.* 2012. V. 10. № 12. P. 2795–2816. doi: 10.3390/md10122795
- Zhu D., Adebisi W.A., Ahmad F. et al.* Recent development of extremophilic bacteria and their application in biorefinery // *Front Bioeng. Biotechnol.* 2020. V. 8. Art. ID 483. doi: 10.3389/fbioe.2020.00483

Antiviral Potential of Marine Bacteria Polysaccharides

**T. A. Kuznetsova^a, N. N. Besednova^a, T. S. Zaporozhets^a, M. S. Kokoulin^b,
Yu. S. Khotimchenko^{c, d}, M. Yu. Shchelkanov^{a, c, d}**

^a*Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Federal Service the Oversight of Consumer Protection and Welfare (Rosпотребнадзор), Vladivostok 690087, Russia*

^b*Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690022, Russia*

^c*Far Eastern Federal University, Vladivostok 690091, Russia*

^d*Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia*

Intensive population interactions between components of plankton and viroplankton of the World Ocean have formed ancient and, at the same time, versatile mechanisms for protecting marine bacteria and archaea from the effects of ocean viruses on them. One of such mechanisms is exopolysaccharides, which are secreted by marine prokaryotes to interact with surface proteins of viral particles and prevent the binding of viral peplomers to receptors of potential target cells. Therefore, antiviral drugs with a wide spectrum of actions, exhibiting also the ability to modulate intercellular interactions, are found in large numbers among exopolysaccharides of marine bacteria. The review analyzes the modern views on exopolysaccharides of marine bacteria, their antiviral potential, and antioxidant and immunomodulatory activity. A brief description of the structural, physical, and chemical properties of such compounds is given and the main mechanisms of antiviral activity of the best-known representatives of this class of organic polymers are disclosed. Exopolysaccharides of marine bacteria are shown to be a promising and extremely rich source of antiviral medicinal substances.

Keywords: marine bacteria, ocean viruses, exopolysaccharides, antiviral activity, cytotoxicity, antioxidant properties, immunomodulators

УДК 594.1:577.15(262.5)

АНТИОКСИДАНТНЫЙ КОМПЛЕКС ЧЕРНОМОРСКОГО ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *FLEXOPECTEN GLABER PONTICUS* (BUCQUOY, DAUTZENBERG ET DOLLFUS, 1889) В ЕСТЕСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ ОБИТАНИЯ

© 2024 г. О. Л. Гостюхина¹, * (ORCID: 0000-0002-0069-7990),
Т. И. Андреевко¹ (ORCID: 0000-0002-1165-5358)

¹Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского (ИнБЮМ) РАН, Севастополь 299011, Россия
*e-mail: gostolga@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.04.2023 г.

После доработки 16.12.2023 г.

Принята к публикации 24.01.2024 г.

Впервые исследован антиоксидантный (АО) комплекс тканей гребешка *Flexopecten glaber ponticus* (Bucquooy, Dautzenberg et Dollfus, 1889) из естественного местообитания в Черном море. Показано, что состояние АО комплекса моллюска отличается выраженной тканевой спецификой на фоне близкого уровня ТБК-активных продуктов во всех исследованных органах. Для жабр гребешка была характерна более высокая активность глутатионредуктазы (ГР), супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы по сравнению с гепатопанкреасом и более высокая активность глутатионпероксидазы (ГП), ГР и каталазы по сравнению с мускулом, а ресурс глутатиона (GSH) в жабрах был ниже, чем в гепатопанкреасе. Это отражает существенный вклад в антиоксидантную защиту жабр гребешка как глутатионовой системы, так и ключевых антиоксидантных ферментов – СОД и каталазы. В гепатопанкреасе моллюска выявлен наибольший уровень глутатиона и высокая активность ГП, сходная с жабрами. Это отражает их весомую роль в АО защите этого органа. На этом фоне активность ГР, СОД и каталазы в гепатопанкреасе была существенно ниже, чем в жабрах. Мускул гребешка отличался наименьшей активностью ГП и низким уровнем GSH, близким к жабрам. Активность СОД в мускуле была сопоставима со значением в жабрах, а активность каталазы и ГР – со значениями в гепатопанкреасе моллюска.

Ключевые слова: восстановленный глутатион, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, супероксиддисмутаза, каталаза, ТБК-активные продукты, *Flexopecten glaber ponticus*, Черное море

DOI: 10.31857/S0134347524030029

Двустворчатые моллюски-фильтраторы – неотъемлемый компонент морских экосистем. Эти организмы ведут, как правило, прикрепленный или малоподвижный образ жизни и имеют фильтрационный способ питания, вследствие чего испытывают влияние ряда естественных и антропогенных факторов среды – концентрации кислорода, температуры, солености, рН, обеспеченности пищей, хищничества, а также подвергаются воздействию загрязняющих веществ (Истомина и др., 2021; Manduzio et al., 2005; Stevens, Gobler, 2018). Результатом этого воздействия может быть

состояние окислительного стресса (ОС) вследствие образования избыточного количества активных форм кислорода (АФК) и изменения прооксидантно-антиоксидантного равновесия в организме моллюсков (Livingstone, 2001; Manduzio et al., 2005; Lushchak, 2011).

Двустворчатые моллюски имеют ряд адаптаций, обеспечивающих поддержание гомеостаза организма и позволяющих им сохранять полноценный метаболизм в постоянно меняющихся условиях среды. Для них велика защитная роль антиоксидантного (АО) комплекса,



Рис. 1. Внешний вид раковин и мягких тканей гребешка *Flexopecten glaber ponticus*.

обеспечивающего необходимый баланс между про- и антиоксидантными процессами и защиту клеток от окислительного повреждения. Эффективность АО системы (АОС) во многом определяет способность моллюсков к адаптации и их устойчивость к стресс-факторам водной среды (Солдатов и др., 2014; Истомина и др., 2021; Livingstone, 2001; Regoli, Giuliani, 2014).

У разных видов двустворчатых моллюсков устойчивость к ОС может отличаться, так как она связана со специфическими для каждого вида особенностями — физиологическим состоянием, тканевой спецификой, соотношением уровня низкомолекулярного и ферментного звена АОС, систем высокого и низкого сродства к субстрату (Солдатов и др., 2014; Regoli, Giuliani, 2014), экологическими особенностями вида (Климова, Чуйко, 2015; Livingstone, 2001; Lushchak, 2011; Istomina et al., 2021).

Показаны различия в особенностях АО комплекса и уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) у ряда черноморских, дальневосточных, средиземноморских, патагонских моллюсков, включая гребешков, в естественной среде их обитания. Выявлена их взаимосвязь с экофизиологическими особенностями этих видов (Бельчева и др., 2016; Гостюхина, Андреевко, 2020; Gostiukhina, Golovina, 2013; Stevens, Gobler, 2018; Rahman et al., 2019; Lompre et al., 2019; Istomina et al., 2021). Различия в работе АО системы обнаруживают между моллюсками не только разных, но и близких видов, — например, между двумя видами дрейссен *Dreissena polymorpha* и *D. bugensis* (Климова, Чуйко, 2015) или у разных цветовых морф одного вида *Mytilus galloprovincialis* (Александрова и др., 2001). Поэтому изучение различий

в функционировании АО комплекса и в его адаптациях у моллюсков, занимающих разные экологические ниши, представляет большой интерес как в нормальных, так и в стрессовых условиях (Stevens, Gobler, 2018). Изучение показателей АО комплекса позволяет более полно подойти к оценке состояния здоровья моллюсков, в том числе гребешков (Lompré et al., 2020).

Черноморский гребешок *Flexopecten glaber ponticus* — один из важных объектов марикультуры средиземноморского региона благодаря его вкусовым качествам и большому содержанию питательных веществ (Marčeta et al., 2016; Berik et al., 2017; Nardi et al., 2018), а также это возможный объект марикультуры у берегов Крыма (Бондарев, 2019; Revkov et al., 2021). Однако в последние десятилетия численность вида в Черном море резко сократилась (Бондарев, 2019). В настоящее время *F. glaber* и *F. glaber ponticus*, как вид и подвид, подвергающиеся сокращению численности, занесены в Красную книгу Крыма и Севастополя (Ревков, 2015). Морские гребешки чувствительны к изменениям окружающей среды — флуктуации pH, температуры или уровня кислорода в воде могут оказывать пагубное воздействие на численность популяции (Christophersen, 2005; Cameron et al., 2019).

Ряд исследований содержит сведения об эмбриональном и личиночном развитии *F. glaber ponticus* (Pirkova, Ladygina, 2017), структуре популяции моллюска (Todorova et al., 2022), а также о состоянии АО комплекса других гребешков, в том числе из семейства Pectinidae, из разных районов Мирового океана (Бельчева и др., 2016; Viarengo et al., 1995; Qian et al., 2015; Lompré et al., 2020; Tan et al., 2020; Istomina et al.,

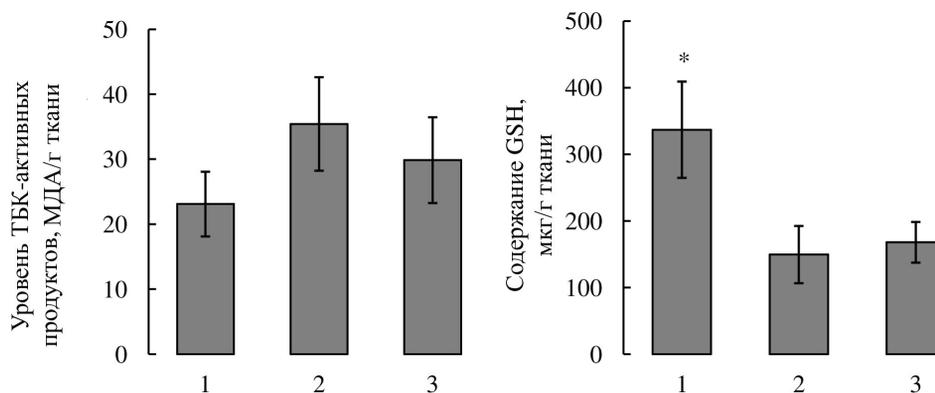


Рис. 2. Уровень ТБК-активных продуктов и глутатиона (GSH) в тканях гребешка *Flexopecten glaber ponticus* (1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – мускул; *достоверные отличия от значений в других тканях ($p \leq 0.05-0.01$)).

2021). Однако в целом экология и биология этого вида изучена недостаточно (Бондарев, 2019), а о состоянии АО комплекса *F. glaber ponticus* из Черного моря информация отсутствует.

Это определило цель настоящего исследования – выявить тканевые особенности АО комплекса у черноморского гребешка *Flexopecten glaber ponticus* в естественной среде его обитания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Половозрелых особей гребешка *Flexopecten glaber ponticus* собирали в сентябре 2020 г. в районе б. Казачья (Севастополь, Крым) Черного моря на глубине 2.0–2.5 м при температуре воды 18–19°C и солености 16–17‰. Длина раковины моллюсков составляла 26–33 мм. Гребешки в момент сбора находились в посленерестовом состоянии, что важно, так как АО комплекс моллюска весьма чувствителен к изменениям, происходящим в организме во время репродуктивного цикла (Солдатов и др., 2014; Истомина и др., 2021). Внешний вид раковин и мягких тканей моллюсков представлен на рис. 1.

После транспортировки моллюсков выдерживали трое сут в проточных аквариумах (150 л) с аэрацией для акклимации. Параметры морской воды в аквариумах были такими же, как и в море (температура воды 18–19°C, соленость 16–17‰, концентрация O_2 – 7.4–7.7 мг/л). Ежедневно воду в аквариуме заменяли для удаления продуктов распада. Моллюсков ежедневно кормили микроводорослями (*Tetraselmis viridis*, штамм IBSS-25, 5–10 мл/50 л морской воды).

У моллюсков извлекали гепатопанкреас, жабры и мускул, органы немедленно замораживали и хранили при -80°C . Замороженные образцы тканей оттаивали на льду и гомогенизировали в 2 мл ледяного 20 мМ Tris/HCl буфера (pH = 7.5), содержащего 0.5 мМ ЭДТА (Cossi et al., 2020) в соотношении ткань : буфер 1 : 10. Гомогенаты центрифугировали (3200g, 15 минут, при 4°C) на центрифуге Centrifuge 5424 R, Eppendorf. Полученные супернатанты сразу использовали для определения активности ферментов.

Активность ГП определяли по накоплению окисленного глутатиона (Paglia, Valentine, 1967), активность ГР – по уменьшению уровня НАДФН (Marques et al., 2016). Активность СОД оценивали по степени ингибирования восстановления нитросинего тетразолия (Nishikimi et al., 1972), а каталазы – по реакции остаточных количеств пероксида водорода с молибдатом аммония (Góth, 1991). Активность ферментов определяли при температуре $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Количество белка в пробах измеряли по методу Лоури при 750 нм (Lowry et al., 1951). Содержание восстановленного глутатиона (GSH) оценивали по реакции с аллоксановым реактивом (Путилина, 1982). Интенсивность ПОЛ измеряли по уровню продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активных продуктов) (Ohkawa et al., 1979).

Для статистической обработки цифрового материала использовали стандартные программы Past 3, Grapher-7. Было исследовано 22 особи. Рассчитывали среднее арифметическое и ошибку среднего. Для оценки достоверности

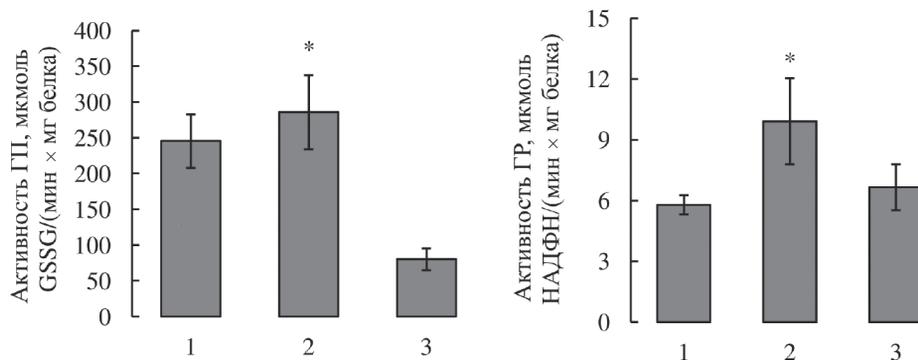


Рис. 3. Активность ГП и ГР в тканях гребешка *Flexopecten glaber ponticus* (1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – мускул; *достоверные отличия от значений в других тканях ($p \leq 0.05$ – 0.01)).

различий применяли U-критерий Манна-Уитни. Различия считали статистически достоверными при значении $p \leq 0.05$. На рисунках результаты представлены как среднее \pm ошибка среднего ($n = 22$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Содержание ТБК-активных продуктов во всех исследованных тканях гребешка было близким (рис. 2). Показатели АО комплекса, напротив, проявили выраженную тканевую специфику. Уровень GSH в гепатопанкреасе был больше по сравнению с жабрами и мускулом гребешка в 2.0–2.25 раза ($p \leq 0.01$) (рис. 2). Активность ГП, напротив, в жабрах и гепатопанкреасе совпадала, что было выше, чем в мускуле в 3.1–3.5 раза ($p \leq 0.01$) (рис. 3). Жабры гребешка отличались и наибольшей активностью ГР, что превосходило активность фермента в гепатопанкреасе в 1.7 раза ($p \leq 0.05$), но совпадало со значением в мускуле (рис. 3). Наибольшие величины активности СОД и каталазы также выявлены в жабрах гребешка (рис. 4). СОД в этой ткани была в 1.5 раза активнее, чем в гепатопанкреасе ($p \leq 0.05$). Активность каталазы была в 2.0 раза выше, чем в гепатопанкреасе ($p \leq 0.05$) и в 1.5 раза больше, чем в мускуле моллюска ($p \leq 0.05$). В остальных случаях различия не были достоверными.

ОБСУЖДЕНИЕ

Состояние АО комплекса варьировало в зависимости от ткани моллюска. АО статус тканей гребешка *Flexopecten glaber ponticus* можно оценить по соотношению уровня глутатиона

с активностью исследованных ферментов и интенсивностью ПОЛ в тканях.

Жабры

В жабрах гребешка ресурс GSH был низким по сравнению с гепатопанкреасом, что сочеталось с наибольшей активностью ГП и ГР. Высокая активность обоих ферментов свидетельствовала об активном обезвреживании H_2O_2 и гидроперекисей с помощью ГП и одновременном наращивании резерва GSH с участием ГР. Считают, что достаточный ресурс GSH в тканях обеспечивает функционирование ГП по инактивации H_2O_2 и гидропероксидов (Ng et al., 2007; Qiu et al., 2013).

Показано, что поддержание активности ГР, и, как следствие, ресурса GSH, имеет важнейшее значение для детоксикации АФК у животных (Halliwell, 1999), и в том числе у ряда видов гребешков (Бельчева и др., 2016; Istomina et al., 2021), мидий, анадары (Гостюхина, Андреевко, 2018; Гостюхина, Солдатов, 2023; Regoli, Principato, 1995), устриц (Trevisan et al., 2016; Elia et al., 2020), а антиоксидантная глутатионовая система (АГС) в целом играет роль важного защитного барьера в жабрах двустворчатых моллюсков (Trevisan et al., 2016). Однако в нашем исследовании, несмотря на сравнительно высокую активность ГП и ГР, уровень GSH в жабрах гребешка был меньше, чем в гепатопанкреасе. Это указывает на более напряженное состояние АО комплекса жабр *F. glaber ponticus* по сравнению с гепатопанкреасом и мускулом, а также на его наиболее высокую чувствительность к потенциальному окислительному стрессу. Это связано с рядом причин.

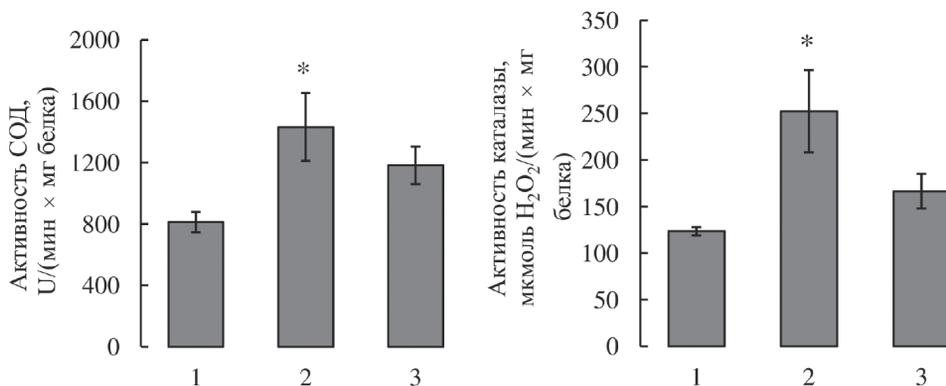


Рис. 4. Активность СОД и каталазы в тканях гребешка *Flexopecten glaber ponticus* (1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – мускул; *достоверные отличия от значений в других тканях ($p \leq 0.05-0.01$)).

В естественных условиях жабры моллюсков испытывают повышенную окислительную нагрузку в связи с их структурно-функциональными особенностями. Жабры гребешков – крупные листовидные органы, имеют большую площадь поверхности и постоянно контактируют с водной средой в процессе газообмена и фильтрационного питания (Marsden, Cranford, 2016). Это способствует поступлению в жабры растворенного в воде кислорода и различных токсических веществ, стимулирующих дополнительное образование АФК и усиление ПОЛ. В свою очередь это может приводить к частичной потере GSH при его активном участии в АО процессах в случае недостатка активности ферментов его биосинтеза и/или энергии АТФ (Борисенок и др., 2019). В исследованиях АО реакций в тканях мидий и гребешков показано, что скорость реакции, катализируемой ГП, ограничена концентрацией GSH в клетке, а между активностью ГП и ГР существует баланс для модуляции реакций с участием H_2O_2 и GSH в качестве субстратов (Qiu et al., 2013).

При этом активность ключевых АО ферментов, СОД и каталазы, в жабрах гребешка наибольшая, что, очевидно, связано с существенным вкладом ферментов этой группы в АО защиту жабр *F. glaber ponticus*. Вероятно, высокая активность каталазы в этом органе обусловлена повышенной концентрацией H_2O_2 , которая образуется не только при дисмутации супероксидного радикала. Источником пероксида водорода могут быть пероксисомы и другие компартменты клетки. Это соединение легко диффундирует через биологические мембраны и может вступать во множество других

свободно-радикальных реакций (Lesser, 2006). Это ведет к риску развития ОС у моллюсков, особенно у чувствительных к уровню кислорода гребешков (Viarengo et al., 1995). Это также свидетельствует о более интенсивной АО защите жабр, чем гепатопанкреаса и мускула, и подтверждается близким уровнем ТБК-активных продуктов во всех исследованных тканях.

Соотношение величин АО комплекса в жабрах, подобное выявленному нами, находим и в ряде других исследований. У гребешка *F. glaber* (контрольная группа) активность ГП в гепатопанкреасе и жабрах близкая, а активность каталазы существенно выше в жабрах (Nardi et al., 2018). Активность каталазы и ГР – наибольшие в жабрах по сравнению с мускулом и гепатопанкреасом у гребешка *Mizuhopecten yessoensis* (Бельчева и др., 2016). Активность СОД в жабрах превышала таковую в гепатопанкреасе гребешка *Aequipecten tehuelchus* (Аргентина) (Lompré et al., 2020). Как и в нашем исследовании в жабрах ряда видов гребешков активность АО ферментов была выше, чем в гепатопанкреасе. В жабрах *Chlamys farreri*, *Swiftopecten swiftii* и *M. yessoensis* выше активность ГР, у *M. yessoensis* – активность каталазы, а у *C. farreri* и *S. swiftii* – активность СОД (Istomina et al., 2021).

Более высокую чувствительность жабр гребешков, чем гепатопанкреаса, к ОС разной природы отмечают и при изучении реакций АО комплекса на различные стресс-факторы. Так, сделан вывод о большей уязвимости АО системы жабр гребешка *F. flexuosus*, чем его гепатопанкреаса, при действии кадмия и закисления,

так как в жабрах отмечали снижение активности ГП, глутатионтрансферазы (ГТ) и других ферментов, а в гепатопанкреасе – напротив, их повышение (Allodi, 2013). Отмечают, что в естественных условиях обитания гребешки способны к высокому накоплению в тканях тяжелых металлов – кадмия, мышьяка, при этом предполагают адсорбцию этих металлов слизистой оболочкой жабр. Жабры являются одним из основных путей, по которому ионы металлов попадают в организм моллюсков, и служат первыми органами-мишенями при их действии (Lompré et al., 2020). Вероятно, это может оказывать прямое повреждающее действие на жаберные клетки и вызывать в них развитие ОС. В частности, среди негативных эффектов кадмия на АО комплекс гребешка *A. tehuelchus* отмечают стимуляцию выработки АФК в клетках и истощение ресурса GSH (Lompré et al., 2020), необходимого при функционировании ГП, ГТ и имеющего важную самостоятельную АО роль.

Вероятно, соотношение компонентов АО защиты между собой и с уровнем ТБК-активных продуктов отражает специфику защиты жабр гребешка как органа, наиболее подверженно-го окислительной нагрузке и несущего в связи с этим высокие риски развития ОС. Полученные нами результаты показывают, что в АО защите жабр велика роль всех изученных АО компонентов, что, вероятно, позволяет поддерживать уровень ТБК-активных продуктов в этом органе гребешка на одном уровне с остальными. Это особенно важно для *F. glaber* как стенобионтного вида, чувствительного к действию многих факторов водной среды (Telahigue et al., 2022).

Гепатопанкреас

Высокая активность ГП в пищеварительной железе, как и в жабрах гребешка, указывает на интенсивное вовлечение GSH в работу фермента. При этом на фоне более низкой активности ГР, чем в жабрах, ресурс GSH в гепатопанкреасе – наибольший среди исследованных тканей. Поддержание ресурса GSH в пищеварительной железе моллюсков, возможно, связано не только с работой ГР, но и с его синтезом *de novo* за счет наличия большого количества пластических ресурсов в этом органе, в том числе аминокислот (Nguyen et al., 2019).

Эти особенности свидетельствуют об активной работе АГС в гепатопанкреасе *F. glaber ponticus* и поддержании резерва GSH на высоком уровне. Подобный АО профиль отмечают и в гепатопанкреасе ряда видов гребешков – высокую активность ГП у *S. swiftii*, *M. yessoensis* и *C. farreri* по сравнению с жабрами (Istomina et al., 2021), у *Pecten maximus* – по сравнению с жабрами и мускулом (Gamble et al., 1995), у *M. yessoensis* активность ГП выше, чем в мускуле (Qui et al., 2013), а у *S. swiftii*, как и в нашей работе, отмечен наибольший уровень GSH (Istomina et al., 2021).

Вероятно, такое состояние АГС типично для гепатопанкреаса, где в целом высок уровень обмена веществ и интенсивность генерации АФК как в норме, так и при действии ОС. Ткань пищеварительной железы, как известно, является основным местом накопления различных ксенобиотиков, способствующих генерации АФК (Livingstone, 1991). Это обуславливает повышенный базальный уровень АФК и ПОЛ в этом органе моллюсков (Regoli, Principato, 1995; Livingstone, 2001), что, вероятно, способствует активной работе АГС в гепатопанкреасе исследованного нами гребешка.

Активность СОД и каталазы в гепатопанкреасе гребешка была наименьшей по сравнению с жабрами и мускулом моллюска. Возможно, эти особенности связаны со следующими причинами.

Показано, что пищеварительная железа гребешков наряду с жабрами способна накапливать тяжелые металлы, особенно кадмий и мышьяк (Marsden, Cranford, 2016; Lompré et al., 2020). У двустворчатых моллюсков перенос ионов металлов в органы пищеварения происходит из жабр, а содержание тяжелых металлов в гепатопанкреасе значительно выше, чем в других тканях (Lompré et al., 2020; Telahigue et al., 2022). В пищеварительной железе морского гребешка *A. tehuelchus* выявлены наибольшие повреждения клеток в естественных условиях вследствие накопления тяжелых металлов, а также сделан вывод о низкой или недостаточной способности этого органа реагировать на повреждение на фоне роста уровня АФК и липидных радикалов (Lompré et al., 2020). Учитывая способность гребешков к высокому накоплению тяжелых металлов, возможно, в гепатопанкреасе исследованного нами вида

активность СОД и каталазы недостаточна для купирования потенциального окислительного стресса, а основной вклад в АО защиту пищеварительной железы *F. glaber ponticus* вносит АГС.

С другой стороны, нельзя исключить, что более низкая активность СОД и каталазы в гепатопанкреасе, чем в жабрах *F. glaber*, может быть связана с дополнительной защитой от окислительного стресса за счет действия металлотионеинов, активно обезвреживающих опасные гидроксильные радикалы (Telahigue et al., 2022). В частности, эти соединения обнаружены в гепатопанкреасе ряда видов гребешков – *F. glaber* (Nardi et al., 2018), *Argopecten irradians* (Yang et al., 2013), *Adamussium colbecki* (Viarengo et al., 1993), *A. tehuelchus* (Giarratano et al., 2023), *M. yessoensis* (Zhukovskaya et al., 2020).

В нашем исследовании это может косвенно подтверждаться близким уровнем ТБК-активных продуктов во всех исследованных тканях *F. glaber ponticus*. В сравнительных исследованиях показано, что активность СОД существенно ниже в гепатопанкреасе ряда видов гребешков, чем в этом же органе митилид (Бельчева и др., 2016; Gamble et al., 1995; Regoli et al., 1997). Это дает основание предположить, что более низкий в целом базовый уровень АФК в тканях гребешков, и в том числе у исследованного нами *F. glaber ponticus*, может способствовать другому распределению величин активности АО ферментов по тканям, чем у моллюсков с более высоким уровнем АФК. Это могло способствовать и более низкой активности СОД в гепатопанкреасе по сравнению с жабрами гребешка в нашем исследовании. Более низкая, чем в жабрах, активность СОД в гепатопанкреасе, могла оказать влияние и на каталазу – активность этого фермента в гепатопанкреасе моллюска также существенно ниже, чем в жабрах. Это подчеркивает согласованное функционирование СОД и каталазы, последовательно инактивирующих супероксидный радикал и H_2O_2 в тканях гребешка. Кроме того, эта особенность дополнительно подтверждает вывод о ведущей роли АГС в АО защите гепатопанкреаса исследованного нами гребешка.

Мускул

Активность ГП в мускуле существенно более низкая, чем в гепатопанкреасе и жабрах

гребешка, и активность ГР, близкая к значениям в остальных тканях, вероятно, обуславливают меньшую степень инактивации H_2O_2 и гидроперекисей в этом органе. При этом содержание GSH в мускуле такое же, как и в жабрах. В отличие от мускула, в жабрах и гепатопанкреасе гребешка оборот GSH, очевидно, происходит интенсивнее, что, возможно, и способствует поддержанию количества ТБК-активных продуктов в этих двух органах на таком же уровне, как и в мускульной ткани *F. glaber ponticus*.

Сравнительно невысокая активность ГП и АГС в целом в мускуле гребешка связана, вероятно, с более низкой интенсивностью обмена веществ в этом органе моллюска, чем в гепатопанкреасе и жабрах. Как известно, скорость метаболизма может влиять на скорость образования АФК и, как следствие, на АО активность (Buttner et al., 2010). Более низкую активность глутатионзависимых ферментов и низкий уровень GSH в мускульной ткани по сравнению с другими органами отмечают и у ряда других видов гребешков – *Pecten maximus*, *M. yessoensis* (Бельчева и др., 2016; Gamble et al., 1995; Qiu et al., 2013).

Кроме того, более низкую активность АО ферментов связывают с меньшим содержанием железа в мускульной ткани по сравнению с гепатопанкреасом и жабрами гребешка. Так, в мускуле *M. yessoensis* установлено наименьшее содержание этого микроэлемента (Бельчева и др., 2016). Известно, что металлы с переменной валентностью, а именно ионы Fe^{2+}/Fe^{3+} , способны инициировать реакцию Габера-Вейса с образованием высокоактивного гидроксильного радикала (Halliwell, Gutteridge, 1984). Образование этих радикалов с участием ионов железа показано в субклеточных фракциях пищеварительной железы и жабр гребешка *A. colbecki* (Regoli et al., 1998). Это может существенно стимулировать развитие ПОЛ и окислительное повреждение этих тканей. Кроме того, способность к накоплению тяжелых металлов в мускуле существенно ниже, чем в других тканях этого моллюска (Marsden, Cranford, 2016). Возможно, низкое содержание ионов железа и тяжелых металлов в мускуле исследованного нами *F. glaber ponticus*, как и у других видов гребешков, могло определить пониженный уровень процессов свободно-радикального

окисления и, как следствие, активности ГП и АГС в целом.

Одной из возможных причин более низкой активности АГС в мускуле может служить и особый состав жирных кислот биомембран этой ткани. Предполагают, что в мускульной ткани гребешка *M. yessoensis* более низкая активность ряда АО ферментов, в том числе ГП и ГР, связана с более низкой чувствительностью липидов мембран в этой ткани к действию ПОЛ (Бельчева и др., 2016).

Активность СОД в мускуле исследованного нами гребешка была близкой к значению в жабрах и выше, чем в гепатопанкреасе, а активность каталазы – близка к активности фермента в гепатопанкреасе, и уступала только жабрам. Вероятно, этим ферментам принадлежит ведущая роль в АО защите мускульной ткани на фоне сравнительно низкой активности АГС моллюска.

Относительно высокая активность каталазы и СОД в мускуле гребешка *F. glaber ponticus* может быть связана также с подвижностью и содержанием макроэргов у моллюска. Для высокоподвижных моллюсков, к числу которых относят гребешков, показано быстрое снижение уровня АТФ и энергетического заряда в мускульной ткани, например, при дефиците кислорода (Livingstone, 1991). Как известно, для поддержания уровня АТФ важен достаточный уровень GSH в тканях моллюсков (Martinez et al., 1995). Так как ресурс GSH и активность ГП в мускульной ткани подвижного гребешка существенно ниже, чем в гепатопанкреасе и/или в жабрах, то возможно, сравнительно высокая активность СОД и каталазы, выявленная нами, позволяет поддерживать необходимую АО защиту мускула в условиях недостатка других антиоксидантов.

Таким образом, состояние АО комплекса гребешка *F. glaber ponticus* из естественной среды обитания отличается выраженной тканевой спецификой на фоне близкого уровня ТБК-активных продуктов во всех исследованных тканях моллюска. Для жабр гребешка была характерна более высокая активность ГР, СОД и каталазы по сравнению с гепатопанкреасом и более высокая активность ГП, ГР и каталазы по сравнению с мускулом, а ресурс глутатиона в жабрах был ниже, чем в гепатопанкреасе. Это

отражает существенный вклад в антиоксидантную защиту жабр гребешка как глутатионовой системы, так и ключевых АО ферментов – СОД и каталазы. В гепатопанкреасе моллюска выявлен наибольший среди его тканей уровень глутатиона и высокая активность ГП, сходная с жабрами, что отражает их весомую роль в АО защите этого органа. На этом фоне активность ГР, СОД и каталазы в гепатопанкреасе была существенно ниже, чем в жабрах. Мускул гребешка отличался наименьшей активностью ГП и низким уровнем GSH, близким к жабрам. Активность СОД в мускуле была сопоставима со значением в жабрах, а активность каталазы и ГР – со значениями в гепатопанкреасе моллюска.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по темам “Механизмы функционирования иммунной системы двустворчатых моллюсков и физиологические основы ее адаптации к абиотическим, биотическим и антропогенным факторам окружающей среды” (№ гос. регистрации 124030100090-4) и “Функциональные, метаболические и молекулярно-генетические механизмы адаптации морских организмов к условиям экстремальных экотопов Черного и Азовского морей и других акваторий Мирового океана” (124030100137-6).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с Руководством Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>). Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биоэтике Института биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН (Протокол 2/23 от 24 августа 2023 года).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Александрова О.Л., Солдатов А.А., Головина И.В. Особенности глутатионпероксидной системы в тканях двух цветовых морф черноморской мидии

- Mytilus galloprovincialis* Lam. // Экол. моря. 2001. Т. 58. С. 22–26.
- Бельчева Н.Н., Довженко Н.В., Истомина А.А. и др. Антиоксидантная система мидии Грея *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) и приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1857) (Mollusca: Bivalvia) // Биол. моря. 2016. Т. 42. № 5. С. 375–380.
- Бондарев И.П. Новые данные о биологии и экологии *Flexopecten glaber* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia, Pectinidae) в Черном море // Вод. биоресурсы и среда обитания. 2019. Т. 2. № 2. С. 36–44.
- Борисенок О.А., Бушма М.И., Басалай О.Н., Радковец А.Ю. Биологическая роль глутатиона // Мед. новости. 2019. Т. 7. № 298. С. 3–8.
- Гостюхина О.Л., Андреевко Т.И. Ферментное и низкомолекулярное звено антиоксидантного комплекса двух видов черноморских моллюсков с разной устойчивостью к окислительному стрессу: *Mytilus galloprovincialis* Lam. и *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) // Журн. общ. биол. 2018. Т. 79. № 6. С. 482–492.
- Гостюхина О.Л., Андреевко Т.И. Активность супероксиддисмутазы и каталазы в тканях трех видов черноморских двустворчатых моллюсков: *Cerastoderma glaucum* (Bruguiere, 1789), *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) и *Mytilus galloprovincialis* Lam. в связи с адаптацией к условиям их обитания // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2020. Т. 56. № 2. С. 24–34.
- Гостюхина О.Л., Солдатов А.А. Влияние голодания на антиоксидантный комплекс двустворчатого моллюска *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) из Черного моря // Биол. моря. 2023. Т. 49. № 1. С. 17–26.
- Истомина А.А., Мазур А.А., Челомин В.П. и др. Интегрированный ответ биомаркёров при оценке качества морской среды на примере двустворчатого моллюска *Mytilus trossulus* (Gould, 1850) // Биол. моря. 2021. Т. 47. С. 176–183.
- Климова Я.С., Чуйко Г.М. Антиоксидантный статус пресноводных двустворчатых моллюсков *Dreissena polymorpha* и *D. bugensis* (Dreissenidae, Bivalvia) из Волжского плёса Рыбинского водохранилища // Поволжский экол. журн. 2015. № 1. С. 33–41.
- Путилина Ф.Е. Определение содержания восстановленного глутатиона в тканях // Методы биохим. исследований. Л.: Изд-во ЛГУ. 1982. С. 183–187.
- Ревков Н.К. Гребешок черноморский *Flexopecten glaber ponticus* Vucquoy, Dautzenberg et Dollfus, 1889 // Красная книга Республики Крым. Животные. Симферополь: АРИАЛ. 2015. С. 39.
- Солдатов А.А., Гостюхина О.Л., Головина И.В. Функциональные состояния антиоксидантного ферментного комплекса тканей *Mytilus galloprovincialis* Lam. в условиях окислительного стресса // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2014. № 3. С. 183–189.
- Berik N., Çankiriligil C., Gül G. Mineral content of smooth scallop (*Flexopecten glaber*) caught Canakkale, Turkey and evaluation in terms of food safety // J. Trace Elem. Med. Biol. 2017. V. 42. P. 97–102.
- Buttemer W.A., Abele D., Costantini D. From bivalves to birds: oxidative stress and longevity // Funct. Ecol. 2010. V. 24. № 5. P. 971–983.
- Cameron L.P., Reymond C.E., Müller-Lundin F. et al. Effects of temperature and ocean acidification on the extrapallial fluid pH, calcification rate, and condition factor of the king scallop *Pecten maximus* // J. Shellfish Res. 2019. V. 38. № 3. P. 763–777.
- Christoffersen G. Effects of environmental conditions on culturing scallop spat (*Pecten maximus*). Bergen, Norway: Univ. of Bergen. 2005.
- Cossi P.F., Herbert L.T., Yusseppone M.S. et al. Toxicity evaluation of the active ingredient acetamiprid and a commercial formulation (Assail® 70) on the non-target gastropod *Biomphalaria straminea* (Mollusca: Planorbidae) // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2020. V. 192. Art. 110248. 10.1016/j.ecoenv.2020.110248
- Elia A.C., Burioli E., Magara G. et al. Oxidative stress ecology on Pacific oyster *Crassostrea gigas* from lagoon and offshore Italian sites // Sci. Total Environ. 2020. V. 739. Art. ID 139886.
- Exploring Themes on Aquatic Toxicology / Ed. S. Allodi. Kerala, India: Research Signpost. 2013.
- Gamble S.C., Goldfarb P.S., Porte C., Livingstone D.R. Glutathione peroxidase and other antioxidant enzyme function in marine invertebrates (*Mytilus edulis*, *Pecten maximus*, *Carcinus maenas* and *Asterias rubens*) // Mar. Environ. Res. 1995. V. 39. № 1-4. P. 191–195.
- Giarratano E., Lompré J.S., Malanga G. Evidences of metabolic alterations and cellular damage in different tissues of scallops *Aequipecten tehuelchus* exposed to cadmium // Mar. Environ. Res. 2023. V. 188. Art. ID 106011.
- Gostiukhina O.L., Golovina I.V. Comparative analysis of antioxidant complex of the Black sea mollusks *Mytilus galloprovincialis*, *Anadara inaequalis* and *Crassostrea gigas* // Hydrobiol. J. 2013. V. 49. № 3. P. 77–84.
- Góth L.A. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range // Clin. Chim. Acta. 1991. V. 196. № 2–3. P. 143–151.

- Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning) // *Free Radical Res.* 1999. V. 31. № 4. P. 261–272.
- Halliwell B., Gutteridge J. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease // *Biochem. J.* 1984. V. 219. № 1. P. 1–14.
- Istomina A., Yelovskaya O., Chelomin V. Antioxidant activity of Far Eastern bivalves in their natural habitat // *Mar. Environ. Research.* 2021. V. 169. P. 105383.
- Lesser M. Oxidative stress in the marine environment: biochemistry and physiological ecology // *Annu. Rev.* 2006. V. 68. P. 253–278.
- Livingstone D.R. Origins and evolution of pathways of anaerobic metabolism in the animal kingdom // *Am. Zool.* 1991. V. 31. P. 522–534.
- Livingstone D.R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms // *Mar. Pollut. Bull.* 2001. V. 42. № 8. P. 656–666.
- Lompré J., Malanga G., Gil M.N. Multiple-biomarker approach in a commercial marine scallop from San Jose gulf (Patagonia, Argentina) for health status assessment // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2020. V. 78. P. 451–462.
- Lowry O., Rosebrough N., Farr A.L., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. № 1. P. 265–275.
- Lushchak V.I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals // *Aquat. Toxicol.* 2011. V. 101. № 1. P. 13–30.
- Manduzio H., Rocher B., Durand F. et al. The point about oxidative stress in mollusks // *Invertebr. Surviv. J.* 2005. V. 91. № 2. P. 91–104.
- Marčeta T., Da Ros L., Marin M.G. et al. Overview of the biology of *Flexopecten glaber* in the North Western Adriatic Sea (Italy): a good candidate for future shellfish farming aims? // *Aquaculture.* 2016. V. 462. P. 80–91.
- Marques A., Piló D., Araújo O. Propensity to metal accumulation and oxidative stress responses of two benthic species (*Cerastoderma edule* and *Nephtys hombergii*): are tolerance processes limiting their responsiveness? // *Ecotoxicology.* 2016. V. 25. № 4. P. 664–676.
- Marsden I.D., Cranford P.J. Scallops and marine contaminants // *Dev. Aquacult. Fish. Sci.* 2016. V. 40. P. 567–584.
- Martínez M., Ferrándiz M.L., Díez A., Miquel H. Depletion of cytosolic GSH decreases the ATP levels and viability of synaptosomes from aged but not from young mice // *Mech. Aging Dev.* 1995. V. 84. № 1. P. 77–81.
- Nardi A., Benedetti M., Fattorini D., Regoli F. Oxidative and interactive challenge of cadmium and ocean acidification on the smooth scallop *Flexopecten glaber* // *Aquat. Toxicol.* 2018. V. 196. P. 53–60.
- Ng C.F., Schafer F.Q., Buettner G.R., Rodgers V.G.J. The rate of cellular hydrogen peroxide removal shows dependency on GSH: mathematical insight into *in vivo* H₂O₂ and GPx concentrations // *Free Radical Res.* 2007. V. 41. № 11. P. 1201–1211.
- Nguyen T.V., Alfaro A.C., Young T., Merien F. Tissue-specific immune responses to *Vibrio* sp. infection in mussels (*Perna canaliculus*): a metabolomics approach // *Aquaculture.* 2019. V. 500. P. 118–125.
- Nishikimi M., Rao N.A., Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972. V. 46. № 2. P. 849–854.
- Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // *Anal. Biochem.* 1979. V. 95. № 2. P. 351–358.
- Paglia D., Valentine W. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase // *J. Lab. Clin. Med.* 1967. V. 70. № 1. P. 158–169.
- Pirkova A.V., Ladygina L.V. Meiosis, embryonic, and larval development of the Black Sea scallop *Flexopecten glaber ponticus* (Bucquoy, Dautzenberg & Dollfus, 1889) (Bivalvia, Pectinidae) // *Mar. Biol. J.* 2017. V. 2. № 4. P. 50–57.
- Qian J., Li Z., Shen Y. et al. Synergistic effect of temperature and salinity on antioxidant enzymes activities of *Chlamys nobilis* // *S. China Fish. Sci.* 2015. V. 11. № 6. P. 49–57.
- Qiu J., Ma F., Fan H., Li A. Effects of feeding *Alexandrium tamarense*, a paralytic shellfish toxin producer, on antioxidant enzymes in scallops (*Patinopecten yesoensis*) and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) // *Aquaculture.* 2013. V. 396–399. P. 76–81.
- Rahman M.A., Henderson S., Miller-Ezzy P. et al. Immune response to temperature stress in three bivalve species: Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and mud cockle *Katylsia rhytiphora* // *Fish Shellfish Immunol.* 2019. V. 86. P. 868–874.
- Regoli F., Giuliani M.E. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms // *Mar. Environ. Res.* 2014. V. 93. P. 106–117.
- Regoli F., Nigro M., Orlando E. Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki* // *Aquat. Toxicol.* 1998. V. 40. № 4. P. 375–392.

- Regoli F., Principato G. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers // *Aquat. Toxicol.* 1995. V. 31. № 2. P. 143–164.
- Regoli F., Principato G., Bertoli E. Biochemical characterization of the antioxidant system in the scallop *Adamussium colbecki*, a sentinel organism for monitoring the Antarctic environment // *Polar. Biol.* 1997. V. 17. P. 251–258.
- Revkov N.K., Pirkova A.V., Timofeev V.A. et al. Growth and morphometric characteristics of the scallop *Flexopecten glaber* (Bivalvia: Pectinidae) reared in cage off the coast of Crimea (Black Sea) // *Ruthenica.* 2021. V. 31. № 3. P. 127–138.
- Stevens A.M., Gobler C.J. Interactive effects of acidification, hypoxia, and thermal stress on growth, respiration, and survival of four North Atlantic bivalves // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2018. V. 604. P. 143–161.
- Tan K., Zhang B., Zhang H. et al. Enzymes and non-enzymatic antioxidants responses to sequential cold stress in polymorphic noble scallop *Chlamys nobilis* with different total carotenoids content // *Fish Shellfish Immunol.* 2020. V. 97. P. 617–623.
- Telahigue K., Rabeh I., Chouba L. et al. Assessment of the heavy metal levels and biomarker responses in the smooth scallop *Flexopecten glaber* from a heavily urbanized Mediterranean lagoon (Bizerte lagoon) // *Environ. Monit. Assess.* 2022. V. 194. № 6. Art. no. 397.
- Todorova V.R., Panayotova M.D., Bekov R.I., Prodanov B.K. Recovery of *Flexopecten glaber* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia: Pectinidae) in the Bulgarian Black Sea waters: recent distribution, population characteristics and future perspectives for protection and commercial utilisation // *Acta Zool. Bulg.* 2022. V. 74. № 3. P. 437–444.
- Trevisan R., Mello D.F., Delapiedra G. et al. Gills as a glutathione-dependent metabolic barrier in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: absorption, metabolism and excretion of a model electrophile // *Aquat. Toxicol.* 2016. V. 173. P. 105–119.
- Viarengo A., Canesi L., Mazzucotelli A., Ponzano E. Cu, Zn and Cd content in different tissues of the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*: role of metallothionein in heavy metal homeostasis and detoxication // *Mar. Ecol.: Prog. Ser.* 1993. V. 95. P. 163–168.
- Viarengo A., Canesi L., Martinez P.G. et al. Pro-oxidant processes and antioxidant defence systems in the tissues of the Antarctic scallop (*Adamussium colbecki*) compared with the Mediterranean scallop (*Pecten jacobaeus*) // *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.* 1995. V. 111. № 1. P. 119–126.
- Yang C., Wang L., Jiang Q. et al. The polymorphism in the promoter region of metallothionein 1 is associated with heat tolerance of scallop *Argopecten irradians* // *Gene.* 2013. V. 526. № 2. P. 429–436.
- Zhukovskaya A.F., Dovzhenko N.V., Slobodskova V.V., Chelomin V.P. Age-related changes in the anti-radical defense system in the tissues of Yesso scallop *Mizuhopecten yessoensis* (JAY1857) // *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. IOP Publ.* 2020. V. 548. № 4. Art. ID 042058.

Antioxidant Complex of the Black Sea Bivalve *Flexopecten glaber ponticus* (Bucquoy, Dautzenberg et Dollfus, 1889) in Natural Habitat

O. L. Gostyukhina^a, T. I. Andreenko^a

^a*Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol 299011, Russia*

The antioxidant (AO) defense complex in tissues of the scallop *Flexopecten glaber ponticus* (Bucquoy, Dautzenberg et Dollfus, 1889) from a natural habitat in the Black Sea was studied for the first time. The results indicated a pronounced tissue specificity of the scallop AO complex along with close levels of TBA-reactive substances in all the studied organs. In the gills of the scallop, the activity of glutathione reductase (GR), superoxide dismutase (SOD), and catalase was higher compared to the hepatopancreas. The activity of glutathione peroxidase (GP), GR, and catalase in the gills was higher than in the muscle. The reduced glutathione (GSH) reserve in the gills was lower than in the hepatopancreas. This indicated that both the glutathione system and the key antioxidant enzymes, SOD and catalase, significantly contributed to the antioxidant defense of the scallop gills. In the hepatopancreas, the level of glutathione was the highest and the activity of GP was high and similar to that in the gills. This reflects their significant role in the AO defense of this organ. However, the activity of GR, SOD, and catalase in the hepatopancreas was significantly lower than in the gills. The scallop muscle was characterized by the lowest GP activity and a low GSH level, close to that in the gills. The SOD activity in the muscle was comparable to its value in the gills, and the activity of catalase and GR was comparable to the values in the scallop hepatopancreas.

Keywords: reduced glutathione, glutathione peroxidase, glutathione reductase, superoxide dismutase, catalase, TBA-reactive substances, *Flexopecten glaber ponticus*, Black Sea

УДК 579.24:57.033

ЭКОЛОГО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ И ТОКСИЧНЫХ ФОРМ МЕТАЛЛОВ НА МОРСКИЕ И УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫЕ БАКТЕРИИ

© 2024 г. И. А. Беленева¹, * (ORCID: 0000-0001-9515-2522),
У. В. Харченко² (ORCID: 0000-0001-5166-5609)

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

²Институт химии ДВО РАН, Владивосток 690022, Россия

*e-mail: beleneva.vl@mail.ru

Поступила в редакцию 18.10.2023 г.

После доработки 15.02.2024 г.

Принята к публикации 19.02.2024 г.

Исследовано влияние новых материалов, а именно полученных нами биогенных наночастиц селена и теллура, на свойства, определяющие патогенный потенциал типовых бактериальных культур и агрессивность штаммов морского происхождения. Воздействие наночастиц на бактерии сравнивали с действием известных токсикантов в экспериментах по определению особенностей роста и активности ферментов на питательных средах, а также адгезии к эритроцитам человека. Использовали следующие концентрации токсикантов: селенита натрия и теллурита калия – 100 мкг/мл, сульфата меди – 10 мкг/мл, наночастиц селена и теллура – 100 мкг/мл. Установлено, что наночастицы в основном подавляли протеолитическую, липолитическую, амилазную, ДНКазную и гемолитическую активность, тогда как ионы меди – стимулировали. Наночастицы селена угнетали синтез пигмента у *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. Наночастицы и растворимые формы селена и теллура подавляли адгезию бактерий к эритроцитам человека, а ионы меди стимулировали ее. Оценка возможных экологических рисков появления/применения изученных токсикантов в морской среде проведена на модели *Artemia salina*. Анализ наночастиц селена и теллура позволил классифицировать их как нетоксичные соединения, а селенит натрия, теллурит калия и сульфат меди – как токсичные.

Ключевые слова: наночастицы, селен, теллур, медь, патогенный потенциал

DOI: 10.31857/S0134347524030036

Патогенность – свойство микроорганизма вызывать заболевание. К факторам патогенности относят способность к адгезии на поверхности эпителия и проникновению внутрь макроорганизма благодаря ферментативной активности в отношении ряда органических субстратов. Ферментами агрессии являются гиалуронидаза, лецитиназа, протеаза, амилаза, ДНК-аза, гемолизины и ряд других. Так, у стафилококков, выделенных из гнойного отделяемого, самыми распространенными расщепляемыми факторами вирулентности были

казеиназа, липаза и лецитиназа (Preda et al., 2021).

Наиболее признанной в настоящее время теорией возникновения новых свойств, регулирующих экспрессию факторов патогенности, является концепция стрессовых ответов микроорганизмов на химические, физические и биологические воздействия.

Вездесущность микроорганизмов и металлов привела к их взаимодействию на протяжении тысячелетий, в результате которого микробы накапливали генетические адаптации,

позволяющие нейтрализовать токсическое воздействие ионов металлов (Frankel et al., 2016). Селен и теллур широко используются в высокотехнологичных отраслях современной промышленности, и загрязнение, вызванное их выбросом в окружающую среду, вызывает озабоченность. Растворимые формы селена и теллура токсичны для микроорганизмов, а элементарные селен Se^0 и теллур Te^0 нерастворимы в воде и имеют низкую биодоступность. Поэтому многие бактерии используют механизм восстановления Se^{4+} и Te^{4+} до их элементарных форм в качестве эффективной стратегии резистентности (Chua et al., 2015).

Использование соединений меди в качестве биоцидов до сих пор является самым распространенным методом защиты от обрастания, в то же время медь является лидером в списке загрязнителей морской среды. Влияние меди на морские организмы активно исследуется (Copper Water Quality ..., 2019). Механизмы адаптации микроорганизмов к токсическому воздействию ионов меди весьма разнообразны и включают в себя, в частности, повышение активности ферментов (Cheng et al., 2022).

Неуклонно возрастающий интерес к использованию биогенных и химически синтезированных наночастиц в биомедицине, экологии и фармацевтике как альтернативы антибиотикам стимулирует исследования в этом направлении. Так, продемонстрирована бактерицидная активность наночастиц теллура против клинических штаммов *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa* (Zare et al., 2012). Сведен в обзор обширный материал об антимикробной активности наночастиц селена в отношении широкого спектра патогенных бактерий (Escobar-Ramírez et al., 2021). Суммированы достижения, касающиеся методов получения наночастиц Se, а также понимания их биологических функций и механизмов использования в биомедицине (Lin et al., 2021). Ранее нами было установлено, что антимикробная активность биогенных наночастиц Te в отношении *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis* и *Candida albicans* была выше, чем у наночастиц Se (Beleneva et al., 2022).

Развитие нанотехнологий неизбежно приводит к выбросу наноматериалов в окружающую

среду и в морские экосистемы (Zhang et al., 2020). Уже сейчас известно о негативном воздействии ряда наноматериалов на гидробионты (Ипатова и др., 2016; Gomes et al., 2013; Prato et al., 2021).

Сведения о влиянии наноразмерных частиц металлоидов на морские микроорганизмы весьма малочисленны. Был проведен глубокий физиологический и транскриптомный анализ адаптивных механизмов у морской бациллы *B. subtilis*, индуцированных алюминиевыми наночастицами (Mu et al., 2016). Описано влияние легированных медью титановых наночастиц на ростовые особенности *Shewanella oneidensis* (Wu et al., 2010). Информация о влиянии тяжелых металлов/металлоидов и произведенных из них наночастиц на патогенный потенциал микроорганизмов и, в частности, на синтез ряда ферментов, также остается весьма фрагментарной (Chua et al., 2015; Maltman, Yurkov, 2015; Elshaer, Shaaban, 2021). Бактериальный ответ на наноматериалы может включать модуляцию факторов патогенности, усиливая их при остром или хроническом воздействии (Zhang et al., 2020). Для прогнозирования долгосрочных последствий появления наноматериалов в морской среде явно недостаточно данных об их свойствах. Требуется более глубокое понимание взаимодействий наночастиц с живыми организмами. Оценка влияния полученных нами биогенных наночастиц селена и теллура на свойства, определяющие патогенный потенциал типовых бактериальных культур и агрессивность штаммов морского происхождения по сравнению с действием известных токсиантов – селенита натрия, теллурита калия и сульфата меди, была целью данного исследования. Кроме того, мы сделали попытку оценить возможный экологический риск применения наночастиц и токсичных соединений металлов в морской среде на модели *Artemia salina*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Бактериальные штаммы

Были использованы бактериальные культуры, хранившиеся при $-85^{\circ}C$ в Музее морских гетеротрофных бактерий ННЦМБ ДВО РАН в криопробирках с морской водой, содержащей

1% пептона, 30% глицерина и $MgSO_4$ в концентрации 5 г/л. Для типовых штаммов *Escherichia coli* ATCC 15034, *Staphylococcus aureus* ATCC 21027, *Pseudomonas aeruginosa* КММ 433 морская вода заменена на дистиллированную. *Pseudoalteromonas piscicida* 2202 ранее выделен нами из гемальной жидкости *Modiolus kurilensis* (Eliseikina et al., 2021), *Pseudoalteromonas shioyasakiensis* 2476 – из биопленок обрастания плексигласа (Beleneva et al., 2022) и *Vibrio alginolyticus* 2637 – из антиобрастающего покрытия. Культивирование морских изолятов проводили на Marine agar 2216 или Marine Broth (Difco), типовых культур – на LB (Miller) бульоне или LB с добавлением 1.2% агара (Sigma).

Способность к росту в присутствии разных добавок тестировали при культивировании бактерий на соответствующей питательной среде с внесением селенита натрия и теллурида калия в конечной концентрации 100 мкг/мл, сульфата меди – 10 мкг/мл, наночастиц селена и теллура – по 100 мкг/мл. Базовую бактериальную суспензию готовили из суточной культуры на физиологическом растворе плотностью 10^8 кл/мл по стандарту мутности (0.5 McFarland). По 500 мкл суспензии вносили в пробирки с 4.5 мл питательной среды с добавками. Контролем служила питательная среда без добавок. Рост биомассы оценивали по изменению оптической плотности при $\lambda = 490$ нм в кювете размером 1 см на спектрофотометре PD-303 Apel (Япония).

Все опыты проводили в трех повторностях, полученные результаты подвергали статистической обработке с расчетом средних значений и стандартного отклонения. Различия между обработанными образцами и контролем определяли с помощью одностороннего дисперсионного анализа (Statistica 6.0). Различия считались достоверными при $p < 0.05$.

Одновременно на базовой суспензии исследовали действие добавок на продукцию ферментов.

Для исследования влияния добавок на продукцию ферментов брали концентрации, при которых испытуемые штаммы заведомо показывали хороший видимый рост. Выбранная концентрация меди была сопоставима с использованными в работах других авторов: 0.05–1 мМ $CuSO_4$ (Stachurska et al., 2020). Более

высокие дозы этого металла мы не анализировали, и не оценивали минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) для исследованных штаммов.

Плотные среды для определения протеазной, амилазной, лецитиназной, липазной активности (чашечный метод) готовили согласно Практикуму (2005), внося в базовую среду соответствующий субстрат. Для определения протеазной активности использовали молочный агар: к 25 г/л агара добавляли 0.5% молоко в соотношении 1 : 2 по объему; агар и молоко стерилизовали отдельно. Бактерии засеивали штрихом на поверхность агара, инкубировали в течение суток, затем измеряли зоны просветления вокруг колоний. Лецитиназную активность определяли выращивая бактерии на яично-желтковом агаре в течение 24 ч при 37°C. Непрозрачные зоны измеряли как индикаторы продукции лецитиназы. Липазную активность тестировали на Marine agar 2216 или на LB агаре с добавлением 0.01% $CaCl_2 \times H_2O$ и 1% твин-80, учитывая зоны преципитации. ДНКазную активность определяли на среде DNase test agar (Merck). Гемолитическую активность определяли по стандартной методике (Справочник..., 1982). На 5% кровяной агар засеивали суточную бактериальную культуру. После 24 ч инкубации при 35°C учитывали характер гемолиза и величину зоны лизиса эритроцитов в мм.

Изучение влияния разных добавок на адгезивные свойства бактерий проводили согласно методике Брилиса с соавторами (1986) в 96-луночном планшете для иммунологических исследований. Бактерии выращивали в течение суток на плотном питательном агаре, затем готовили суспензию на физиологическом растворе с плотностью 10^8 кл./мл по стандарту мутности (0.5 McFarland). По 100 мкл суспензии вносили в 1 мл соответствующей питательной среды в стерильных пенициллиновых флаконах с добавками; контролем служила среда без добавок. Культуры в течение суток инкубировали в термостате при 30°C. Затем в лунки планшета вносили по 20 мкл суточной бактериальной суспензии и нативных эритроцитов человека (0(I) группа крови Rh+) с плотностью 2.8×10^8 , численность которых предварительно оценивали на цитометре CytoFLEX 5 (Bekman Coulter). Планшет инкубировали в термостате при 30°C в течение 30 мин

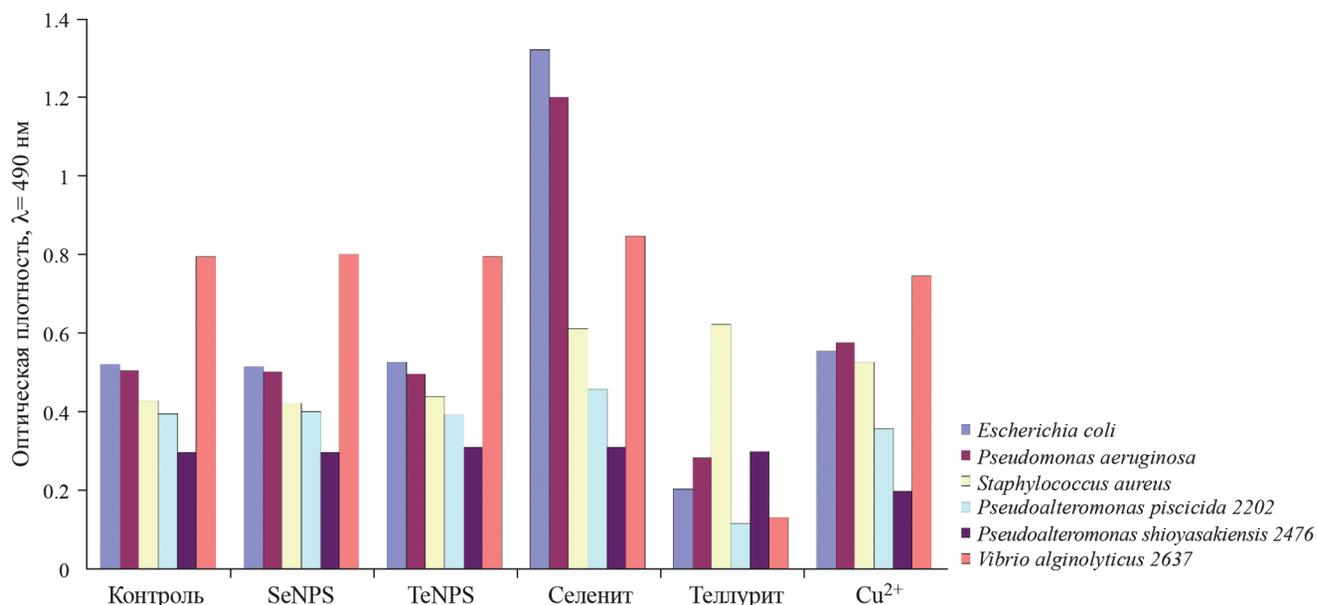


Рис. 1. Рост бактериальных культур на питательной среде в присутствии разных токсикантов. Контроль — среда без добавок.

при регулярном встряхивании. Затем готовили мазки, фиксировали в пламени горелки, окрашивали по Граму и микроскопировали с иммерсией. Адгезивные свойства оценивали, учитывая средний показатель адгезии (СПА) — среднее количество бактерий, прикрепившихся к одному эритроциту. Подсчитывали не менее 25 эритроцитов, учитывая не более 5 эритроцитов в одном поле зрения.

Количественное определение белка проводили на планктонных культурах микрометодом по Доусону (Dawson et al., 1986) в модификации с биуретовым методом определения активности протеазы по убыли альбумина по Нетрусову (Практикум..., 2005). Бактерии выращивали в течение суток на плотном питательном агаре, затем готовили суспензию на физрастворе с плотностью 10^8 кл./мл по стандарту мутности (0.5 McFarland). По 500 мкл суспензии вносили в пробирки с 4.5 мл физраствора с добавками, конечные концентрации которых были идентичны таковым в эксперименте по изучению адгезии. Контролем служил физиологический раствор без добавок. После суток культивирования к 0.5 мл бактериальной суспензии добавляли 1 мл 1% альбумина в калий-фосфатном буфере, при pH = 7.5 и инкубировали 30 мин при 35°C. Реакцию останавливали на льду и осаждали клетки центрифугированием в течение 15 мин при 3000 об/мин. Затем 1 мл супернатанта смешивали с 1 мл 6% раствора

NaOH и 0.1 мл раствора Бенедикта. Через 10 мин созревания окраски при комнатной температуре измеряли оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре PD-303 при длине волны равной 340 нм против физраствора и/или физраствора с добавлением растворов наночастиц, селенита, теллурита и сульфата меди.

Расчет активности протеазы (мг/мин×мл) проводили по Нетрусову (Практикум..., 2005), используя формулу:

$$\text{Арг.} = 10 \times (1 - (D_0 - D_{k1}/D_{k2}))/t \times D_m,$$

где D_0 — оптическая плотность в опыте, D_k — оптическая плотность в контроле, D_m — оптическая плотность бактериальной взвеси, t — время инкубации, k_1 — 0.5 мл супернатанта и 1 мл физиологического раствора, k_2 — 1 мл 1% раствора альбумина и 0.5 мл физраствора.

Тест на токсичность биогенных наночастиц и известных токсикантов проводили на модели *Artemia salina* в статических условиях в течение 48 ч при комнатной температуре в закрытых стеклянных чашках Петри. Каждое соединение тестировали на трех партиях артемии (Manfra et al., 2015).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Все исследованные бактериальные штаммы были способны расти на питательных средах при следующих концентрациях токсикантов:

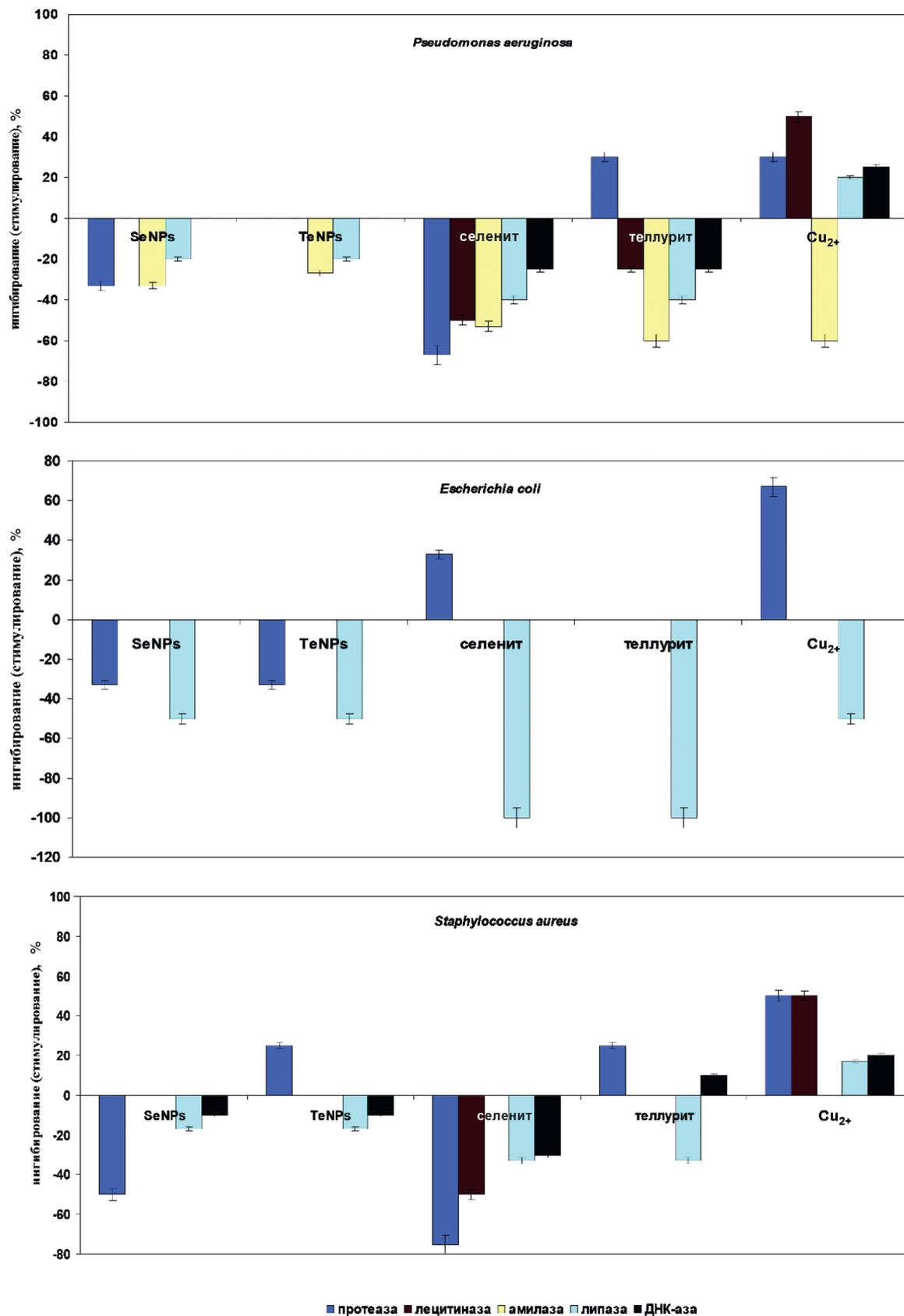


Рис. 2. Влияние токсикантов на продукцию ферментов условно-патогенными бактериями.

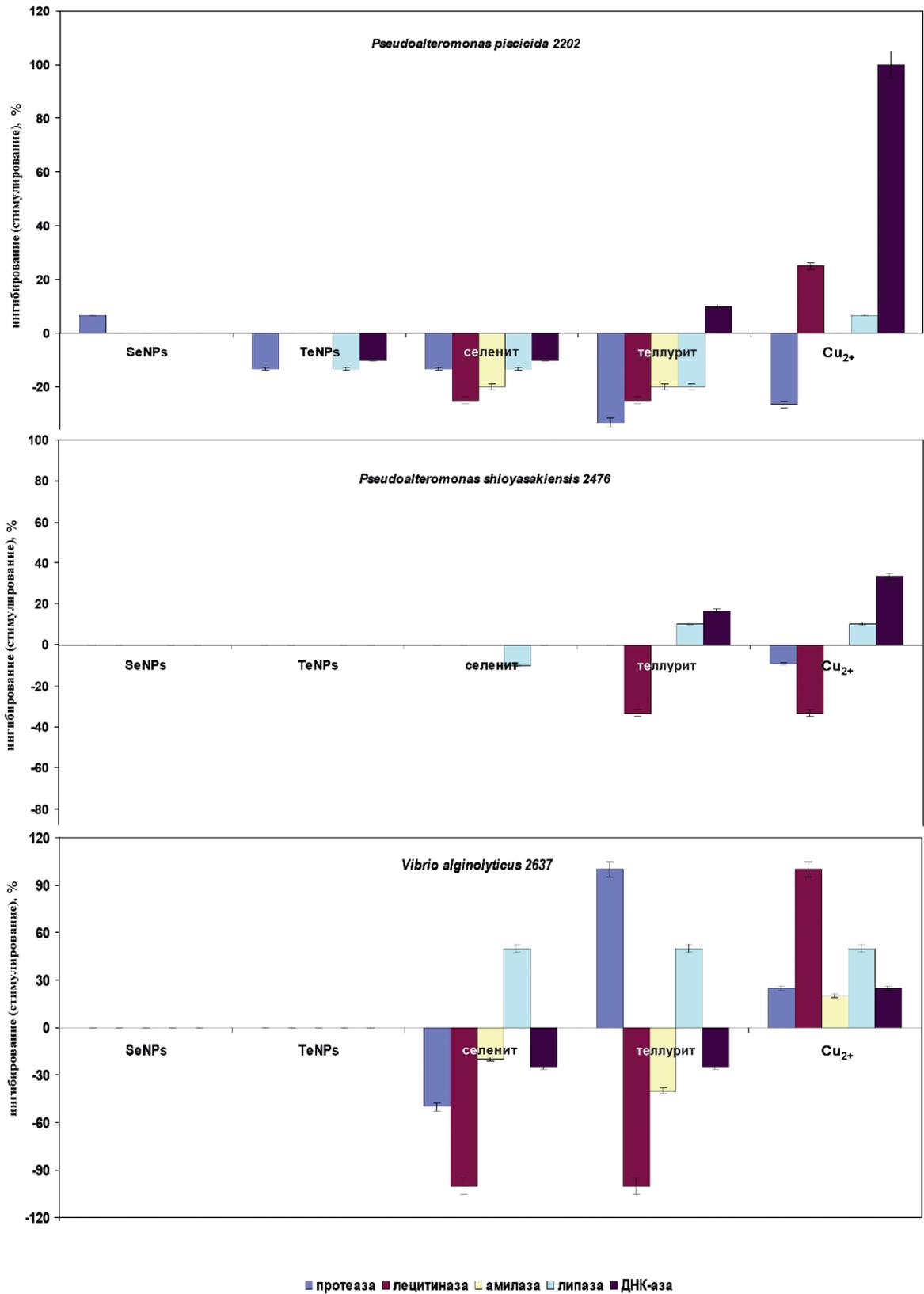


Рис. 3. Влияние токсикантов на продукцию ферментов морскими бактериями.

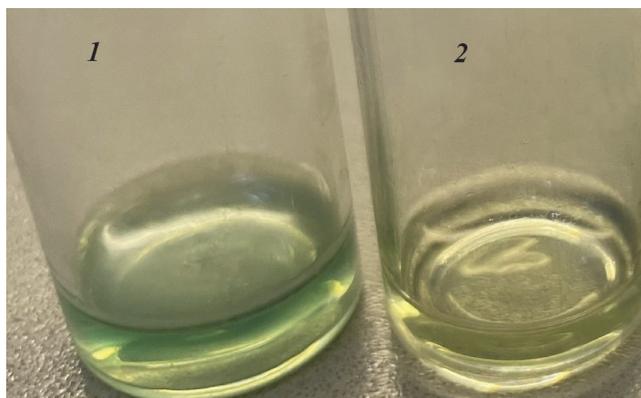


Рис. 4. Влияние токсикантов на пигментообразование *Pseudomonas aeruginosa*. В первом флаконе рост бактерий в среде без добавок, во втором – с селенитом натрия.

селенита натрия и теллурида калия – 100 мкг/мл, сульфата меди – 10 мкг/мл, наночастиц селена и теллура – 100 мкг/мл, что контролировали высевом на плотные среды. Все штаммы были способны редуцировать селенит натрия с образованием частиц Se^0 , придающих красный цвет среде культивирования. Три бактериальные культуры из шести (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Pseudoalteromonas shioyasakiensis* 2476) восстанавливали теллурид калия до Te^0 с образованием наночастиц черного цвета в концентрации солей металлоидов 100 мкг/мл.

Добавки наночастиц селена и теллура практически не влияли на бактериальный рост, в отличие от добавок селенита и теллурида (рис. 1). Так, добавление селенита приводило к стимулированию роста *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *Vibrio alginolyticus* 2637 и *Pseudoalteromonas piscicida* 2202, а добавка теллурида подавляла рост *E. coli*, *P. aeruginosa*, *V. alginolyticus* 2637 и *P. piscicida* 2202. Добавка сульфата меди стимулировала рост всех трех тестовых культур и подавляла рост морских изолятов: *P. piscicida* 2202, *V. alginolyticus* 2637 и *Pseudoalteromonas shioyasakiensis* 2476.

Оценка ферментативной активности тестируемых культур на плотном агаре чашечным методом выявила ряд особенностей (рис. 2, 3). Добавки селенита натрия и наночастиц Se оказывали подавляющее действие на активность протеазы, за исключением этого фермента у *E. coli*. Добавки теллурида калия стимулировали протеазу у *P. aeruginosa* и *V. alginolyticus* 2637, а теллурида и наночастиц – у *S. aureus*. Добавка

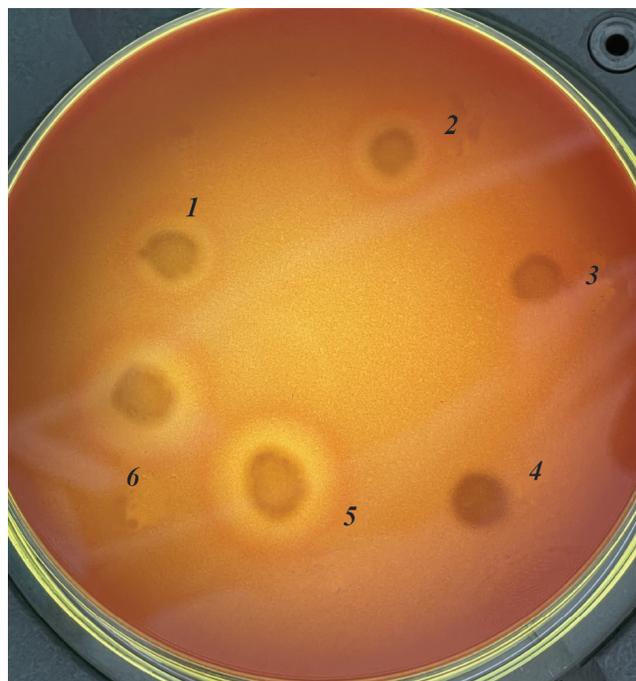


Рис. 5. Влияние добавок на гемолиз эритроцитов *Pseudomonas aeruginosa*. 1 – контроль без добавок, 2 – наночастицы Se, 3 – наночастицы Te, 4 – селенит натрия, 5 – теллурид калия, 6 – сульфат меди.

сульфата меди стимулировала активность протеазы у всех типовых штаммов и у *V. alginolyticus* 2637, а также активность лецитиназы, липазы, ДНКазы и гемолиза у большинства штаммов, тогда как добавление наночастиц селена и теллура не оказывало стимулирующего эффекта. При добавлении селенита наблюдалось более выраженное подавляющее воздействие на активность ферментов по сравнению с добавкой теллурида. Эти результаты коррелируют с данными количественного анализа активности протеазы. Следует отметить, что наночастицы Se у *P. piscicida* 2202 стимулировали пигментообразование, а ионы меди – угнетали. Наночастицы селена, селенит и медь оказывали угнетающее воздействие на выработку пигмента у *P. aeruginosa* (рис. 4), наночастицы Se подавляли пигментацию у *S. aureus*.

Культуры *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *P. piscicida* 2202 показали β -гемолиз, который стимулировался ионами меди. Селенит подавлял гемолитическую активность *P. aeruginosa* и *P. piscicida* 2202, а теллурид стимулировал таковую *P. aeruginosa*, *S. aureus* и подавлял активность *P. piscicida* 2202 (рис. 5). Влияние наночастиц селена и теллура на гемолитическую активность

Таблица 1. Влияние добавок на активность бактериальной протеазы (мг/мин×мл)

Бактерия	К	SeNP _s	TeNP _s	Селенит	Теллурит	Cu ²⁺
<i>Escherichia coli</i>	0.30 ± 0.025	0.240 ± 0.041	0.196 ± 0.041*	0.420 ± 0.073*	0.115 ± 0.016*	0.783 ± 0.241*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.752 ± 0.14	0.683 ± 0.180*	0.546 ± 0.120*	0.609 ± 0.087*	0.769 ± 0.210	1.466 ± 0.300*
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.357 ± 0.091	0.187 ± 0.023*	0.530 ± 0.118*	0.312 ± 0.095	0.522 ± 0.114*	0.513 ± 0.150*
<i>Pseudoalteromonas piscicida</i> 2202	0.449 ± 0.087	0.486 ± 0.091	0.417 ± 0.096*	0.419 ± 0.108*	0.385 ± 0.099*	0.191 ± 0.041*
<i>Pseudoalteromonas shioyasakiensis</i> 2476	0.387 ± 0.081	0.394 ± 0.111	0.379 ± 0.12	0.527 ± 0.127*	0.753 ± 0.171*	0.316 ± 0.097*
<i>Vibrio alginolyticus</i> 2637	0.428 ± 0.098	0.330 ± 0.078*	0.419 ± 0.131	0.433 ± 0.128	0.110 ± 0.012*	0.625 ± 0.105*

*Различия достоверны при $p < 0.05$ по отношению к контролю;

К – значения оптической плотности при длине волны 490 нм в физиологическом растворе через сутки без добавок.

Таблица 2. Влияние добавок на средний показатель адгезии к эритроцитам у исследуемых бактерий

Бактерия	СПА	SeNP _s	TeNP _s	Селенит	Теллурит	Cu ²⁺
<i>Escherichia coli</i>	3.13 ± 1.55	1.87 ± 1.06*	1.07 ± 0.26*	0	0	1.60 ± 0.74*
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.20 ± 0.86	1.33 ± 0.49*	1.80 ± 0.77*	1.13 ± 0.35*	2.27 ± 1.03*	3.53 ± 0.74*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.87 ± 0.64	2.67 ± 0.72	2.53 ± 0.99	2.07 ± 0.96*	1.20 ± 0.41*	2,53 ± 0.83*
<i>Pseudoalteromonas piscicida</i> 2202	3.0 ± 1.0	3.00 ± 0.92	2.67 ± 0.62*	2.20 ± 0.86*	2.33 ± 0.73*	3.20 ± 0.94*
<i>Pseudoalteromonas shioyasakiensis</i> 2476	2.27 ± 1.03	2.20 ± 0.67	2.40 ± 0.83	2.13 ± 0.77	2.00 ± 0.75	2.86 ± 0.64
<i>Vibrio alginolyticus</i> 2637	10.33 ± 2.82	8.13 ± 1.19*	7.27 ± 1.87	5.00 ± 1.41*	2.60 ± 0.91*	11.60 ± 1.45

*Различия достоверны при $p < 0.05$ по отношению к контролю;

СПА – средний показатель адгезии (среднее количество бактерий, прикрепившихся к одному эритроциту).

культур было нейтральным. Культуры *E. coli*, *P. shioyasakiensis* 2476 и *V. alginolyticus* 2637 показали α-гемолиз, действие токсикантов на него не выявлено.

Анализ активности протеазы показал ее количественные колебания в зависимости от вида бактерий и токсического агента (табл. 1). Так, добавка наночастиц селена и теллура приводила к ингибированию синтеза протеазы, за исключением *P. piscicida* 2202 и *P. shioyasakiensis* 2476. У стафилококка под воздействием наночастиц теллура наблюдалось стимулирование протеазы. Ионы меди оказывали стимулирующее действие на большинство протестированных штаммов.

Исследование адгезивных свойств бактерий показало, что добавки наночастиц Se и Te, а также их растворимых форм, селенита и теллурита, подавляли адгезию (табл. 2). Исключение составил штамм *P. shioyasakiensis* 2476, адгезию которого стимулировали добавки наночастиц Te. В присутствии ионов меди наблюдалось стимулирование адгезии у четырех из шести тестируемых культур.

Полученные нами биогенные наночастицы используются в разрабатываемых антиобрастающих покрытиях. В связи с этим мы провели оценку возможных экологических рисков применения наночастиц в морской среде по сравнению с известными токсикантами на модели *Artemia salina*. Данные по токсичности добавок

Таблица 3. Токсичность биогенных наночастиц на модели *Artemia salina* по сравнению с известными токсикантами

Токсиканты	SeNP _s	TeNP _s	Cu ²⁺	Селенит	Теллурид
LC ₅₀ * (мкг/мл)	> 100	> 100	15	22.4	35.5

*Эффективная концентрация, при которой наблюдается смертность 50% популяции *Artemia salina*.

в отношении *A. salina* позволили классифицировать наночастицы как нетоксичные соединения, в отличие от растворимых селенита натрия, теллурида калия и сульфата меди (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно об устойчивости и/или способности к восстановлению солей металлоидов бактериями *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (Medina-Cruz et al., 2023), *Pseudomonas aeruginosa* (Kora, Rastogi, 2016). Представители *Pseudoalteromonas*, *Alteromonas*, *Shewanella* и широкого ряда морских бактерий восстанавливают селенит и теллурид до элементарного состояния, чтобы устранить токсичность этих соединений (Rathgeber et al., 2002; Cheng et al., 2024).

Повышение концентрации токсических веществ воспринимается микроорганизмами как фактор, индуцирующий совокупный стрессорный ответ (Aljerf, AlMasri, 2018). Медь является самым распространенным металлом-загрязнителем. Высокие концентрации меди разрушают биологические макромолекулы. Поэтому бактерии разработали сложные механизмы гомеостаза с использованием многочисленных стратегий, нивелирующих токсическое воздействие ионов меди. В ряде случаев адаптационные механизмы бактерий могут привести к изменению маркёров вирулентности. У некоторых штаммов *S. aureus* имеются дополнительные гены гомеостаза меди, важные для вирулентности, они опосредуют гипертолерантность к меди (Tarrant et al., 2019). Ключевые гены толерантности к меди у *Vibrio alginolyticus* способны регулировать чувствительные к меди гены, обуславливающие такие фенотипы вирулентности, как адгезия, гемолиз, образование биопленок, подвижность (Gordon et al., 1994). Резистентность *P. aeruginosa* к меди дает избирательные преимущества при колонизации и персистенции в больничных условиях и во внешней

среде (Virieux-Petit et al., 2022). Анализ литературных данных свидетельствует о том, что существует положительная корреляция между чувствительностью к меди и вирулентностью.

В большинстве случаев наноматериалы гораздо менее токсичны, чем растворимые металлы. Так, биогенные нанопалочки теллура обладали меньшей цитотоксичностью по сравнению с растворимыми солями металлоида, использованного для их производства (Forootanfar et al., 2015). Однако антимикробная активность наночастиц Se и Te в отношении *E. coli*, *P. aeruginosa* и *S. aureus* была более высокой по сравнению с селенитом Se⁴⁺ (Zonago et al., 2015). Сценарий взаимодействия наночастиц с микроорганизмами зависит от ряда факторов. Так, высвобождение селена из легированных серебром наночастиц селена не оказывало антибактериального действия на планктонные культуры условно-патогенных бактерий, а при контакте с покрытием с внедренными наночастицами проявляло высокую токсичность против *S. aureus* (Liang et al., 2022).

Ранее нами установлено, что меньшая цитотоксичность биогенных наночастиц по сравнению с растворимыми солями металлоидов была обусловлена низкой способностью высвобождения ионов селена и теллура, чему препятствует внешний органический слой биомолекул, покрывающих наночастицы (Beleneva et al., 2022). Это свойство позволяет безопасно использовать бионаночастицы в морских экосистемах.

В нашем исследовании ионы меди и селена стимулировали рост всех трех тестовых культур, тогда как воздействие наночастиц было нейтральным. Имеется информация об увеличении роста *P. aeruginosa* в присутствии ингибирующих концентраций меди (Leitão, Sá-Correia, 1997). Численность *Aeromonas hydrophyla* при росте в питательной среде с добавлением 10 мкг/мл CuSO₄ выросла в 1.6 раза (Обухова, 2016). Сообщается о повышении значений оптической

плотности в присутствии 1 мМ сульфата меди почвенных изолятов, культивируемых на жидкой питательной среде (Stachurska et al., 2020). Добавление 10 и 50 мкг/л меди в морскую среду привело к заметному увеличению относительной численности и активности гетеротрофов (Aljerf, AlMasri, 2018). Селен способствовал увеличению скорости роста *Lactobacillus bulgaricus* (Xia et al., 2007), концентрация селенита до 80 мкг/мл стимулировала рост штаммов молочнокислых бактерий (Yang et al., 2018). Добавление селена усиливало рост ряда почвенных бактерий (Асуїна et al., 2013). Кумар с соавторами (Kumar et al., 2013) подчеркивали, что некоторые ингредиенты среды могут взаимодействовать с ионами металлов, снижая их токсичность. Однако в нашей работе было отмечено стимулирование бактериального роста медью и селеном относительно контроля, содержащего среду без добавок. Рост бактерий, определенный по увеличению значений оптической плотности, был подтвержден высевом в серийных разведениях на чашки с питательным агаром.

В богатых органикой прибрежных водах, испытывающих хроническое антропогенное загрязнение, в том числе тяжелыми металлами, существует опасность стимулирования роста условно-патогенной микрофлоры растворимыми соединениями меди и селена. При этом попавшие в морскую среду наночастицы селена и теллура в исследованных концентрациях не оказывают стимулирующего действия на бактериальный рост.

Полученные в настоящем исследовании данные свидетельствуют о более значимом стимулирующем действии ионов меди на активность ряда ферментов, имеющих прямое отношение к патогенности, по сравнению с наночастицами и солями металлоидов. Несмотря на большое количество работ, описывающих воздействие тяжелых металлов/металлоидов на микроорганизмы, исследований по влиянию токсичных металлов на метаболизм металлотолерантных бактерий ничтожно мало. По данным О.В. Обуховой (2016), сульфат меди стимулировал продукцию лецитиназы у штаммов *A. hydrophyla*, а добавление сульфата кадмия в ростовую среду привело к появлению у штамма *Citrobacter freundii* гемолиза, отсутствовавшего при росте

в среде без металла. Как сообщают Ченг с соавторами (Cheng et al., 2022), адаптивные механизмы штамма *Planococcus* sp. O5 к стрессу медью включали синтез и репарацию белка. Ранее сообщалось о стимулировании медью активности протеазы у *Enterococcus hirae* (Lu, Solioz, 2001).

Ионы металлоидов, как и медь, являясь триггером адаптивных реакций, изменяют микробный метаболизм, влияя, в том числе, и на факторы патогенности. Ион TeO_3^{2-} усиливал биопленкообразование у *P. aeruginosa*, его воздействие значительно повлияло на 129 белков *P. aeruginosa*, при этом синтез 64 белков активировался, а 65 – подавлялся (Chua et al., 2015). У *Erythromonas ursincola* KR99 и *Erythromicrobium ramosum* E5 в присутствии соединений Te наблюдалось увеличение синтеза белка и АТФ (Maltman, Yurkov, 2015).

Описано влияние наночастиц на синтез ряда микробных продуктов. У *Bacillus subtilis*, обработанной наночастицами Al_2O_3 , индуцировалась продукция внеклеточного белка сурфактина, который усиливает подвижность и хемотаксис (Mu et al., 2016). Аналогичные результаты были обнаружены при реакции *Shewanella oneidensis* MR-1 на наночастицы TiO_2 , легированные медью (Wu et al., 2010). Наночастицы Se подавляли синтез протеазы у *P. aeruginosa* (Elshaer, Shaaban, 2021), эти данные коррелируют и с нашими результатами. Нами не обнаружено сведений о влиянии наночастиц металлоидов на микробную продукцию ферментов, относящихся к факторам вирулентности, таких как лецитиназа, липаза, гемолитическая активность. Есть информация, что наночастицы оксида цинка ZnO снижали выработку пиоцианина, протеазы и гемолизина у *P. aeruginosa* (Ali et al., 2020). По данным Бузолевой с соавторами (2013), медь не оказывала влияния на синтез лецитиназы и липазы, а также не влияла на гемолитическую активность у *Yersinia pseudotuberculosis* и двух видов сальмонелл. Наши эксперименты показали, что наночастицы подавляли активность ферментов, а ионы меди, напротив, в большинстве случаев стимулировали ее. Очевидно, что отклик на воздействие токсиканта зависел от ряда факторов, в том числе и от вида (штамма) бактерий. Растворимый теллур также стимулировал протеазную и гемолитическую активность

у *S. aureus* и *P. aeruginosa*, что вызывает серьезную озабоченность, так как в условиях повышенной антропогенной нагрузки на прибрежные морские экосистемы возрастает угроза появления эпидемически опасных штаммов.

Во многих случаях микробный пигмент является фактором патогенности, так как проявляет противовоспалительные или цитотоксические свойства, как, например, желтый стафилоксантин *S. aureus*, сине-зеленый пеоцианин видов *Pseudomonas* (Liu, Nizet, 2009). Стафилоксантин обезвреживает активные формы кислорода и способствует внутриклеточной вирулентности и устойчивости *S. aureus* (Zhang et al., 2020). Поэтому сами пигменты становятся логическими мишенями для терапевтических вмешательств. В нашем исследовании было показано, что наночастицы Se весьма перспективны в этой области, так как они успешно подавляли синтез пигмента у *P. aeruginosa* и *S. aureus*. Полученные результаты подтверждаются другими исследованиями (Elshaer, Shaaban, 2021). Однако стимулирующее действие наночастиц Se на пигментобразование у *P. piscicida* 2202 требует дальнейшего изучения. Известно, что при низкой концентрации хрома пигментобразование у *S. aureus* стимулировалось, а при высокой происходило прекращение продукции пигмента, хотя штамм не терял способности к росту (Lima de Silva et al., 2012). Напротив, у *P. aeruginosa* степень продукции пигмента имела прямую связь с наличием хрома, достигая максимума при наивысшей концентрации металла, определяющей предел роста бактерий. Следовательно, в некоторых случаях способность производить пигмент может быть напрямую связана с устойчивостью к металлам.

Адгезия является стартовым механизмом в формировании биопленок, в составе которых микробные клетки характеризуются повышенной устойчивостью к воздействию токсикантов и факторов иммунной системы. Ионы меди стимулировали адгезию на модели эритроцитов человека у большинства проверенных культур. Стимулирование адгезии ионами меди было выявлено у *Yersinia pseudotuberculosis* (Бузолева и др., 2013). В отличие от меди наночастицы селена и теллура адгезию активно подавляли, что говорит в пользу их экологичности в морской среде.

Нельзя не отметить стимулирующее действие меди на испытанные нами штаммы морских бактерий. Медь и растворимые формы селена и теллура в ряде случаев приводили к активизации бактериального роста, адгезии и активности ферментов агрессии. Таким образом, загрязнение окружающей среды включает адаптационные механизмы, способные ускорить эволюционные траектории морских микроорганизмов, что может привести к нежелательным для человека последствиям.

Для подтверждения безопасности бионаночастиц для морских организмов мы протестировали их токсичность на модели *Artemia salina*. Анализ токсичности позволяет классифицировать их как нетоксичные безопасные соединения в соответствии с Директивой 93/67/ЕЕС Европейской комиссии по классификации опасности веществ. В доступных литературных источниках нам не удалось обнаружить информацию об анализе токсичности биогенных наночастиц селена и теллура. Сообщается о химически синтезированных наночастицах селена, высоко токсичных для дафнии *Daphnia magna* (Selmani et al., 2020), также используемой в качестве модельного организма. Известно, что биологическая активность наночастиц определяется их морфологией и физико-химическими свойствами. В то же время показатели ЕС₅₀ для селенита и теллурита на модели *A. salina* классифицируют эти соединения как опасные, что согласуется с данными, полученными на модели *D. magna* (Selmani et al., 2020). Показатель токсичности сульфата меди – 15 для *A. salina* оказался практически идентичным – 14.21 и для другого вида артемий *A. franciscana* (Manfra et al., 2015). Таким образом, использование наночастиц Se и Te в качестве противообрастающих добавок взамен токсичных медных биоцидов может снизить нагрузку на окружающую среду.

Под воздействием изученных токсикантов биологические свойства бактериальных культур подвергались изменениям. Такие изменения затронули как физиологические, так и биохимические показатели, а именно, адгезию к эритроцитам, активность протеазы, лецитиназы, липазы, ДНКазы у большинства из тестированных штаммов. Характер изменений определялся свойствами токсикантов, составом

питательной среды, а также систематическим положением бактерий и специфичностью штаммов. Антропогенное загрязнение металлами может привести к эскалации вирулентности как бактериальных патогенов, так и морских бактерий, обладающих ферментами агрессии. В целом данные проведенного исследования подтвердили экологическую безопасность использования полученных нами биогенных наночастиц в морской среде.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Брилис В.И., Брилене Т.А., Ленцнер Х.П., Ленцнер А.А. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов // Лабораторное дело. 1986. № 4. С. 210–212.
- Бузолева Л.С., Богатыренко Е.А., Ким А.В. Влияние тяжелых металлов на факторы патогенности у возбудителей сапрозоонозов // Фундамент. исслед. 2013. № 10, ч. 14. С. 3076–3079.
- Ипатов В.И., Дмитриева А.Г., Дрозденко Т.В. Сравнительная токсичность солей и наночастиц серебра для микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* // Токсикол. вестн. 2016. № 2 (137). С. 45–51.
- Обухова О.В. Влияние солей меди, цинка и кадмия на рост и уровень биологической агрессивности условно-патогенной микрофлоры // Тр. ВНИРО. 2016. Т. 162. С. 184–189.
- Практикум по микробиологии. М.: Академия. 2005.
- Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: Медицина. 1982.
- Acuña J.J., Jorquera M.A., Barra P.J. et al. Selenobacteria selected from the rhizosphere as a potential tool for Se biofortification of wheat crops // Biol. Fertil. Soils. 2013. V. 49. P. 175–185.
- Ali S.G., Ansari M.A., Alzohairy M.A. et al. Effect of biosynthesized ZnO nanoparticles on multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* // Antibiotics. 2020. V. 9. № 5. Art. ID 260. doi: 10.3390/antibiotics9050260
- Aljerf L., AlMasri N. A gateway to metal resistance: Bacterial response to heavy metal toxicity in the biological environment // Ann. Adv. Chem. 2018. V. 2. P. 032–044.
- Beleneva I.A., Kharchenko U.V., Kukhlevsky A.D. et al. Biogenic synthesis of selenium and tellurium nanoparticles by marine bacteria and their biological activity // World J. Microbiol. Biotechnol. 2022. V. 38. № 11. Art. ID 188. doi: 10.1007/s11274-022-03374-6
- Cheng Z., Shi C., Gao X. et al. Biochemical and metabolomic responses of Antarctic bacterium *Planococcus* sp. O5 induced by copper ion // Toxics. 2022. V. 10. № 6. Art. ID 302. doi: 10.3390/toxics10060302
- Cheng M., Liang L., Sun Y. et al. Reduction of selenite and tellurite by a highly metal-tolerant marine bacterium // Int. Microbiol. 2024. V. 27. P. 203–212.
- Chua S.L., Sivakumar K., Rybtke M. et al. C-di-GMP regulates *Pseudomonas aeruginosa* stress response to tellurite during both planktonic and biofilm modes of growth // Sci. Rep. 2015. V. 5. Art. ID 10052. doi: 10.1038/srep10052
- Copper Water Quality Guideline for the Protection of Marine and Estuarine Aquatic Life (Reformatted Guideline from 1987), Water Quality Guideline Series, no. WQG-04, Prov. B.C., Victoria B.C.: B.C. Minist. Environ. Climate Change Strategy. 2019.
- Dawson R.M.C., Elliot D.C., Elliot W.H., Jones K.M. Data for Biochemical Research, 3rd ed., New York: Oxford Univ. Press. 1986.
- Eliseikina M.G., Beleneva I.A., Kukhlevsky A.D. et al. Identification and analysis of the biological activity of the new strain of *Pseudoalteromonas piscicida* isolated from the hemal fluid of the bivalve *Modiolus kurilensis* (F.R. Bernard, 1983) // Arch. Microbiol. 2021. V. 203. № 7. P. 4461–4473.
- Elshaer S.L., Shaaban M.I. Inhibition of quorum sensing and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by biologically synthesized gold and selenium

- nanoparticles // *Antibiotics*. 2021. V. 10. № 12. Art. ID 1461.
doi: 10.3390/antibiotics10121461
- Escobar-Ramírez M.C., Castañeda-Ovando A., Pérez-Escalante E. et al.* Antimicrobial activity of Se-nanoparticles from bacterial biotransformation // *Fermentation*. 2021. V. 7. Art. ID 130.
doi 10.3390/fermentation7030130
- Forootanfar H., Amirpour-Rostami S., Jafari M. et al.* Microbial-assisted synthesis and evaluation the cytotoxic effect of tellurium nanorods // *Mater. Sci. Eng. C*. 2015. V. 49. P. 183–189.
- Frankel M.L., Booth S.C., Turner R.J.* How bacteria are affected by toxic metal release // *Metal Sustainability: Global Challenges, Consequences, and Prospects*, R.M. Izatt, Ed., 1st ed., Hoboken, N.J.: Wiley, 2016.
- Gomes T., Araújo O., Pereira R. et al.* Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Mar. Environ. Res.*, 2013, vol. 84, pp. 51–59.
- Gordon A.S., Howell L.D., Harwood V.* Responses of diverse heterotrophic bacteria to elevated copper concentrations // *Can. J. Microbiol.* 1994. V. 40. № 5. P. 408–411.
- Kora A.J., Rastogi L.* Biomimetic synthesis of selenium nanoparticles by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853: An approach for conversion of selenite // *J. Environ. Manage.* 2016. V. 181. P. 231–236.
- Kumar R., Nongkhlaw M., Acharya C., Joshi S.R.* Growth media composition and heavy metal tolerance behaviour of bacteria characterized from the sub-surface soil of uranium rich ore bearing site of Domiasiat in Meghalaya // *Indian J. Biotechnol.* 2013. V. 12. P. 115–119.
- Leitão J.H., Sá-Correia I.* Effects of growth-inhibitory concentrations of copper on alginate biosynthesis in highly mucoid *Pseudomonas aeruginosa* // *Microbiology*. 1997. V. 143. P. 481–488.
- Liang X., Zhang S., Gadd G.M. et al.* Fungal-derived selenium nanoparticles and their potential applications in electroless silver coatings for preventing pin-tract infections // *Regener. Biomater.* 2022. V. 9. Art. ID rbac013. doi: 10.1093/rb/rbac013
- Lima de Silva A.A., de Carvalho M.A., de Souza S.A. et al.* Heavy metal tolerance (Cr, Ag AND Hg) in bacteria isolated from sewage // *Braz. J. Microbiol.* 2012. V. 43. № 4. P. 1620–1631.
- Lin W., Zhang J., Xu J.-F., Pi J.* The advancing of selenium nanoparticles against infectious diseases // *Front Pharmacol.* 2021. V. 12. Art. ID 682284.
doi: 10.3389/fphar.2021.682284
- Liu G.Y., Nizet V.* Color me bad: microbial pigments as virulence factors // *Trends Microbiol.* 2009. V. 17. № 9. P. 406–413.
- Lu Z.H., Solioz M.* Copper-induced proteolysis of the CopZ copper chaperone of *Enterococcus hirae* // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 51. P. 47822–47827.
- Maltman C., Yurkov V.* The effect of tellurite on highly resistant freshwater aerobic anoxygenic phototrophs and their strategies for reduction // *Microorganisms*. 2015. V. 3. № 4. P. 826–838.
- Manfra L., Savorelli F., Di Lorenzo B. et al.* Intercalibration of ecotoxicity testing protocols with *Artemia franciscana* // *Ecol. Indic.* 2015. V. 57. P. 41–47.
- Medina-Cruz D., Truong L.B., Sotelo E. et al.* Bacterial-mediated selenium nanoparticles as highly selective antimicrobial agents with anticancer properties // *RSC Sustainability*. 2023. V. 1. P. 1436–1448.
- Mu D., Yu X., Xu Z. et al.* Physiological and transcriptomic analyses reveal mechanistic insight into the adaption of marine *Bacillus subtilis* C01 to alumina nanoparticles // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. art. ID 29953.
doi: 10.1038/srep29953
- Prato E., Fabbrocini A., Libralato G. et al.* Comparative toxicity of ionic and nanoparticulate zinc in the species *Cymodoce truncata*, *Gammarus aequicauda* and *Paracentrotus lividus* // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2021. V. 28. P. 42891–42900.
- Preda M., Mihai M.M., Popa L.I. et al.* Phenotypic and genotypic virulence features of staphylococcal strains isolated from difficult-to-treat skin and soft tissue infections // *PLoS One*. 2021. V. 16. № 2. Art. ID e0246478. doi: 10.1371/journal.pone.0246478
- Rathgeber C., Yurkova N., Stackebrandt E. et al.* Isolation of tellurite- and selenite-resistant bacteria from hydrothermal vents of the Juan de Fuca Ridge in the Pacific Ocean // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 6. № 9. P. 4613–4622.
- Selmani A., Ulm L., Kasemets K. et al.* Stability and toxicity of differently coated selenium nanoparticles under model environmental exposure settings // *Chemosphere*. 2020. V. 250. Art. ID 126265.
doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.126265
- Stachurska X., Środa B., Dubrowska K. et al.* Tolerance of environmental bacteria to heavy metals // *Acta Sci. Pol. Zootech.* 2020. V. 19. № 2. P. 63–74.
- Tarrant E., Riboldi G.P., McIlvin M.R. et al.* Copper stress in *Staphylococcus aureus* leads to adaptive changes in central carbon metabolism // *Metallomics*. 2019. V. 11. № 1. P. 183–200.
- Virieux-Petit M., Hammer-Dedet F., Aujoulat F. et al.* From copper tolerance to resistance in *Pseudomonas*

- aeruginosa* towards patho-adaptation and hospital success // *Genes*. 2022. V. 13. № 2. Art. ID 301. doi: 10.3390/genes13020301
- Wu B., Huang R., Sahu M. et al. Bacterial responses to Cu-doped TiO₂ nanoparticles // *Sci. Total Environ.* 2010. V. 408. № 7. P. 1755–1758.
- Xia S.K., Chen L., Liang J.Q. Enriched selenium and its effects on growth and biochemical composition in *Lactobacillus bulgaricus* // *J. Agric. Food Chem.* 2007. V. 55. № 6. P. 2413–2417.
- Yang J., Wang J., Yang K. et al. Antibacterial activity of selenium-enriched lactic acid bacteria against common food-borne pathogens in vitro // *J. Dairy Sci.* 2018. V. 101. № 3. P. 1930–1942.
- Zare B., Faramarzi M.A., Sepehrizadeh Z. et al. Bio-synthesis and recovery of rod-shaped tellurium nanoparticles and their bactericidal activities // *Mater. Res. Bull.* 2012. V. 47. № 11. P. 3719–3725.
- Zhang C., Sun R., Xia T. Adaption/resistance to antimicrobial nanoparticles: Will it be a problem? // *Nano Today*. 2020. V. 34. Art. ID 100909. doi: 10.1016/j.nantod.2020.100909
- Zonaro E., Lampis S., Turner R.J. et al. Biogenic selenium and tellurium nanoparticles synthesized by environmental microbial isolates efficaciously inhibit bacterial planktonic cultures and biofilms // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. Art. ID 584. doi: 10.3389/fmicb.2015.00584

Ecological and Biological Aspects of Effect of Nanoparticles and Toxic Forms of Metals on Marine and Opportunistic Bacteria

I. A. Beleneva^a, U. V. Kharchenko^b

^a*Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia*

^b*Institute of Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690022, Russia*

We studied effects of new materials such as, in particular, earlier obtained biogenic selenium and tellurium nanoparticles on the properties that determine pathogenic potential of type bacterial cultures and aggressiveness of marine-derived strains. We compared the effect of nanoparticles on bacteria to that of known toxicants in several experiments aimed to determine the growth characteristics and activity of enzymes on nutrient media, and also the adhesion to human red blood cells. The following concentrations of toxicants were used: sodium selenite and potassium tellurite, 100 µg/mL; copper sulfate, 10 µg/mL; selenium and tellurium nanoparticles, 100 µg/mL. We found that nanoparticles mainly inhibited the proteolytic, lipolytic, amylase, DNase, and hemolytic activities, whereas copper ions stimulated them. Selenium nanoparticles inhibited the pigment synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Nanoparticles and soluble forms of selenium and tellurium suppressed the bacterial adhesion to human red blood cells, while copper ions stimulated it. We also carried out an assessment of possible environmental risks of emergence/use of the toxicants under study in the marine environment using an *Artemia salina* model. Based on the analysis of selenium and tellurium nanoparticles, we could classify them as nontoxic compounds and sodium selenite, potassium tellurite, and copper sulfate as toxic ones.

Keywords: nanoparticles, selenium, tellurium, copper, pathogenic potential

УДК 595.34-13:582.276

ВЛИЯНИЕ ВИДА И КОНЦЕНТРАЦИИ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ НА РАЦИОН И ПРОДУКЦИЮ ЯИЦ У КОПЕПОД *CALANIPEDA AQUAEDULCIS* KRICHAGIN, 1873 И *ARCTODIAPTOMUS SALINUS* (DADAY, 1885)

© 2024 г. Л. О. Аганесова¹, * (ORCID: 0000-0003-4052-7985),
А. Н. Ханайченко¹ (ORCID: 0000-0002-4334-9996)

¹Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского (ИнБЮМ) РАН, Севастополь 299011, Россия
*e-mail: la7risa@gmail.com

Поступила в редакцию 17.04.2023 г.

После доработки 20.09.2023 г.

Принята к публикации 24.01.2024 г.

В экспериментальных условиях исследовано влияние концентрации гаптофитовой *Isochrysis galbana* и динофитовой *Prorocentrum cordatum* микроводорослей на величину суточного рациона питания и скорость продукции яиц солоноватоводных копепоид *Arctodiaptomus salinus* и *Calanipeda aquaedulcis*. Суточные рационы питания изученных копепоид логарифмически возрастали с увеличением концентрации микроводорослей. Максимальные значения суточного рациона у обоих видов копепоид были отмечены при питании *I. galbana* с концентрацией 170–196 мкг С/мл. Максимальные значения среднесуточной продукции яиц (*EPR*) у самок *C. aquaedulcis* (129% массы тела в углеродном эквиваленте) получены при питании микроводорослями *I. galbana* с концентрацией 15.4 мкг С/мл и *P. cordatum* с концентрацией 4 мкг С/мл. Максимальные значения *EPR* у самок *A. salinus* составляли 34% углеродного эквивалента массы самки при питании *P. cordatum* с концентрацией 26 мкг С/мл, и 45% углеродного эквивалента массы самки при питании *I. galbana* с концентрацией 8.9 мкг С/мл. Дальнейшее увеличение концентрации микроводорослей приводило к снижению значений *EPR*. Эффективность использования потребленной пищи на генеративную продукцию копепоид в углеродном эквиваленте (*GGE*, %) была значительно выше у *C. aquaedulcis*, чем у *A. salinus*, и не зависела от вида и концентрации микроводорослей.

Ключевые слова: копепоиды, *Arctodiaptomus salinus*, *Calanipeda aquaedulcis*, суточный рацион питания, среднесуточная продукция яиц

DOI: 10.31857/S0134347524030044

Копепоиды семейств Pseudodiaptomidae (*Calanipeda aquaedulcis* Krichagin, 1873) и Diaptomidae (*Arctodiaptomus salinus* (Daday, 1885)) являются типичными представителями голопланктонных каланоидных копепоид. Оба вида относятся к эвригалинным осмоконформерам (Svetlichny et al., 2012a). Широкий диапазон толерантности к солености (от 0.1 до 35‰ для *C. aquaedulcis* и до 50‰ для *A. salinus*) (Svetlichny et al., 2012a) и к температуре — *C. aquaedulcis* встречается в водоемах от -1 до 30°C (Lazareva, 2018), а *A. salinus* - от 3 до 29°C (Rokneddine,

Chentoufi, 2004; Jiménez-Melero et al., 2012), позволяет этим копепоидам выживать, развиваться и размножаться в разнообразных водоемах, как в морских, так и в пресноводных, от северных до южных широт.

Копепоиды обоих видов вынашивают яйца в яйцевом мешке, прикрепленном к самке. Самки *A. salinus* могут производить как субитанные, так и диапаузирующие (покоящиеся) яйца, выживающие в экстремальных условиях (высушивание и широкий диапазон температур), а самки *C. aquaedulcis* производят только

субитанные яйца. Именно отсутствие покоящихся яиц позволяет *C. aquaedulcis* населять только постоянные водоемы: прибрежные лагуны, солончаковые болота, соленые заболоченные переходные зоны и эстуарии, расположенные вдоль Атлантического побережья Марокко (Ramdani et al., 2001), Испании (Frisch et al., 2006), Средиземноморского побережья Европы (Brucet et al., 2008), Северной Африки (Ramdani et al., 2001), Северо-Западной Азии (Ustaoglu, 2004). Этот вид обитает на небольших глубинах в Азовском (Гунько, Алдакимова, 1963), Каспийском (Куделина, 1950; Гарбер, 1951) и Аральском морях (Кортунова и др., 1972; Andreev et al., 1992), в прибрежных озерах и лиманах Черного моря, в частности, Керченского полуострова. В Севастопольской бухте популяция *C. aquaedulcis* существовала до вселения хищного гребневика *Mnemiopsis leydii* A. Agassiz, 1865 (см.: Gubanova et al., 2001). Из приустьевых опресненных участков морей *C. aquaedulcis* проникает во внутренние пресные водоемы и населяет водохранилища и реки средней полосы России (Вьюшкова, Гурова, 1968; Lazareva, 2018).

Напротив, *A. salinus*, широко распространенный в Европе, Азии и Северной Африке (Rokneddine, Chentoufi, 2004), обитает как в постоянных, так и во временных водоемах, в сильно минерализованных пресных, солоноватоводных и соленых континентальных водоемах; населяет стоячие воды, от малых горных бассейнов до больших соленых озер (Tolomeev, 2002). Наличие в биологическом цикле диапаузирующих яиц и высокая толерантность вида к широкому диапазону солености и температуры (Jiménez-Melero et al., 2007) позволяют *A. salinus* обитать в пересыхающих и небольших минерализованных карстовых водоемах (Marrone et al., 2006), а также в крупных меромиктических озерах, например, в сибирских, от слабо- до гиперсоленых (Andreev et al., 1992; Tolomeev et al., 2010). *A. salinus* периодически достигает высокой численности в некоторых постоянных и временных пересыхающих соленых прибрежных озерах Восточного Крыма, на Керченском полуострове (Шадрин и др., 2008). Этот вид копепод характерен для водоемов, характеризующихся низким видовым разнообразием планктона и короткими трофическими цепями (Lapesa et al., 2004; Barkhatov et al., 2023).

Несмотря на то, что метаболическая пластичность позволяет копеподам обоих видов выживать и размножаться в сходных условиях, места обитания этих двух видов в основном не пересекаются, по-видимому, из-за конкуренции. Например, после вселения в Аральское море *C. aquaedulcis* стал доминировать в зоопланктоне и вытеснил полностью аборигенного *A. salinus* (Plotnikov et al., 2021).

Эти виды копепод представляют ценную кормовую базу для рыб-планктонофагов и, благодаря высокой толерантности, могут использоваться в аквакультуре для кормления личинок как морских, так и пресноводных, как умеренных, так и тропических ценных видов рыб (Gurkan et al., 2023). Отсутствие каннибализма (половозрелые особи не выедают собственные ранние науплиальные стадии) позволяет выращивать совместно все стадии развития (науплиальные, копеподитные и взрослые), что можно считать технологическим преимуществом при массовом культивировании обоих видов копепод. В отличие от них взрослые стадии морских Calanoida выедают собственные яйца и младшие науплиальные стадии.

Известно, что копеподы обоих видов питаются разнообразными взвешенными частицами, детритом, бактерио-, фито- и микропланктоном (Гарбер, 1951; Tolomeev, 2002; Lapesa et al., 2004; Marrone et al., 2006; Brucet et al., 2008; Tolomeev et al., 2010), и их рацион может изменяться в зависимости от состава и концентрации пищи. Однако до настоящего времени отсутствуют данные о влиянии концентрации определенных видов нанопланктонных (2-20 мкм) микроводорослей на рационы, продукцию яиц и эффективность использования потребленной пищи на генеративную продукцию копепод *C. aquaedulcis* и *A. salinus*.

Для оценки способности данных видов копепод конвертировать углерод потребленной пищи в углерод их генеративной продукции и для использования этих данных в разработке оптимальной технологии массового культивирования необходимо было определить, как вид и концентрация микроводорослей влияет на рацион питания и продукцию яиц копепод в искусственных условиях. Цель данной работы заключалась в определении суточных рационов и продукции яиц *C. aquaedulcis* и *A. salinus*,

а также расчете эффективности использования пищи на генеративную продукцию копепод в широком диапазоне концентраций двух видов микроводорослей при оптимальной температуре.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Эксперименты проводили с использованием лабораторных культур копепод *A. salinus* (AS) (длина просомы 0.9–1.04 мм) и *C. aquaedulcis* (CA) (длина просомы 0.6–0.7 мм) при оптимальной для выживаемости, развития и размножения обоих видов температуре $21 \pm 1.5^\circ\text{C}$ (Аганесова, 2013). В качестве культуральной среды для копепод применяли суспензию микроводорослей в морской воде. Исходная черноморская вода ($17.8 \pm 0.2\%$) до приготовления среды для культивирования микроводорослей проходила следующие этапы последовательной очистки: грубый песочный фильтр, отстаивание, последовательная фильтрация через картриджные фильтры (с размером пор 10, 5 и 1 мкм), стерилизация ультрафиолетом и двукратная пастеризация. Морскую воду обогащали средой Уолна (Coutteau, 1996). Монокультуры микроводорослей выращивали в накопительном режиме при круглосуточном освещении интенсивностью 5 тыс. лк. Использовали широко распространенные, постоянно находящиеся в суспензии в толще воды, легко культивируемые морскую гаптофитовую микроводоросль класса Prymnesiophyceae – *Isochrysis galbana* (размер клеток 3–6 мкм) (ISO) и динофитовую микроводоросль класса Dinophyceae – *Prorocentrum cordatum* (размер клеток 12–14 мкм) (PRO) (Khanaychenko et al., 2019), которые, согласно нашим данным, были оптимальны для питания, воспроизводства и развития обоих видов копепод (Аганесова, 2021). Для кормления копепод использовали культуры в экспоненциальной фазе роста.

Для определения суточного рациона питания и среднесуточной продукции яиц копепод брали микроводоросли обоих видов в четырех разных концентрациях (табл. 1, 2). Адаптацию лабораторных одновозрастных когорт копепод CA и AS к питанию микроводорослями PRO и ISO при определенных концентрациях проводили минимум в течение двух недель, т.е. 8 лабораторных одновозрастных когорт были

адаптированы к условиям, при которых проводили все дальнейшие эксперименты.

Эксперименты проводили в стеклянных сосудах цилиндрической формы объемом 50 мл при круглосуточном освещении 2 тыс. лк. В опытные сосуды отсаживали половозрелых особей, находящихся на пике репродуктивного периода: по 17 самок и 8 самцов CA (в возрасте 15–20 сут) и по 8 самок и 4 самца AS (в возрасте 25–30 сут), так что плотность посадки составляла 0.5 экз./мл и 0.25 экз./мл, соответственно. Согласно нашим предварительным данным соотношение самцов и самок копепод приблизительно 1 : 2 необходимо для регулярного пополнения сперматеки самок спермой для оптимального оплодотворения.

Эксперименты по питанию каждого вида копепод проводили в течение суток при четырех разных концентрациях каждой микроводоросли в двукратной повторности. Концентрацию микроводорослей в экспериментальных сосудах с копеподами и в контрольных сосудах без копепод определяли методом проточной цитометрии (Cytomics TM FC 500, Beckman Coulter, США) в начале эксперимента и по истечении 24 часов.

Суточный рацион (G , кл./экз./сут) определяли по разнице между начальными и конечными концентрациями клеток микроводорослей в экспериментальных (с копеподами) и контрольных (без копепод) сосудах, рассчитывая на количество копепод, согласно методике собственной модификации, позволяющей учитывать темп размножения и отмирания микроводорослей без выедания их копеподами (Frost, 1972) по модифицированным формулам:

$$G = F \times \frac{C_t^o - C_o}{\ln C_t^o - \ln C_o}, \quad (1)$$

$$F = \frac{V}{n} \times \frac{\ln C_t^k - \ln C_t^o}{\Delta t}, \quad (2)$$

где F – скорость фильтрации микроводорослей или скорость осветления среды, (мкл/экз./сут), V – объем среды в сосуде (мл), n – число копепод в сосуде (экз.), C_o – начальные численности микроводорослей в контроле и эксперименте (кл./мл), C_t^k и C_t^o – конечные численности микроводорослей в контроле и эксперименте, Δt – продолжительность эксперимента (сут). В связи с тем, что для производства яиц необходимо

присутствие самцов копепод, было допущено усреднение скорости потребления микроводорослей самками и самцами, что характерно для функционирования популяции, в которой присутствуют и самцы, и самки, а яйца производят только самки.

Эксперименты по определению среднесуточной продукции яиц (EPR , яиц/самка/сут) проводили на тех же выборках копепод СА и АS и в тех же экспериментальных сосудах при аналогичных четырех концентрациях двух видов микроводорослей. В течение 10 сут эксперимента ежедневно в одно и то же время просматривали копепод под микроскопом МБС-12 при увеличении 8×4 , подсчитывали и изымали произведенное самками потомство, одновременно проводя замену культуральной среды. Значения EPR получали, разделив общее количество яиц, произведенное всеми самками в течение эксперимента, на количество самок и длительность эксперимента (в сутках).

После окончания эксперимента копепод измеряли, их размеры в дальнейшем использовались для расчета углеродного эквивалента биомассы. Сухую биомассу копепод (W , мкг) рассчитывали, учитывая линейные размеры взрослых особей (по: Svetlichny et al., 2012b):

$$W = 0,13 \left(L_{pr} d_{pr}^2 \right)^{1,013}, \quad (3)$$

где L_{pr} – длина и d_{pr} – ширина просомы (мм).

Сухую биомассу яиц (W_{egg} , мкг) рассчитывали по формуле Светличного с соавторами (Svetlichny et al., 2012b):

$$W_{egg} = 0,167k\pi d_{egg}^3, \quad (4)$$

где $k = 0.000476$ для субитанных яиц, d_{egg} – средний диаметр яиц (мкм).

Для сравнения эффективности использования пищи на производство яиц копепод проводили пересчет рационов, веса копепод и продукции яиц в углеродные единицы. При расчете углеродного эквивалента концентрации микроводорослей использовали данные из литературы: *I. galbana* (Berggreen et al., 1988), *P. cordatum* (Dam, Colin, 2005). Пересчет массы копепод в углеродные единицы (W_C , мкг С;

W_{Cegg} , мкг С) (Kjørboe, Sabatini, 1994). Углеродная масса копепод составляла 40% от их сухой массы.

Суточный рацион рассчитывали как скорость потребления микроводорослей в сутки в пересчете на углеродный эквивалент клеток (G , мкг С/экз./сут). Соотношение суточного рациона в углеродном эквиваленте (G , мкг С/экз./сут) и массы копепод в углеродных единицах (W_C , мкг С) выражали в процентах и получали относительные (удельные) значения рациона копепод в углеродных единицах (G , %).

Эффективность использования пищи на производство яиц (GGE , %) вычисляли по формуле:

$$GGE = (EPR/G)100\%, \quad (5)$$

где EPR и G выражены в углеродных единицах.

Для всех полученных данных были рассчитаны средние арифметические (M), доверительный интервал (95% CI), стандартные отклонения (SD), достоверность ($p < 0.05$) различий выборочных средних с помощью t -критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамика значений суточного рациона (G) копепод *Arctodiaptomus salinus* и *Calanipeda aquaedulcis* при питании микроводорослями *Isochrysis galbana* и *Prorocentrum cordatum* представлена на рис. 1 и в табл. 1 и 2. Рационы копепод возрастали логарифмически с увеличением содержания пищи в среде и почти выходили на плато при максимальной концентрации микроводорослей. При одинаковых исходных концентрациях микроводорослей значения суточного рациона были значимо выше у АS, чем у СА, что обусловлено большей массой первого вида (масса АS = 7.12 мкг С/экз., масса СА = 2.4 мкг С/экз.). Более высокие рационы копепод обоих видов как в количестве клеток, так и в углеродном эквиваленте получены при питании мелкоразмерными ISO по сравнению с PRO.

Так, с возрастанием концентрации ISO с меньшей массой (25.9 пг С/кл.) от 2×10^5 до 6.6×10^6 кл./мл (от 4.2 до 170.4 мкг С/мл) рацион СА увеличивался с 331 до 1387×10^3 кл./экз./сут (от 8.6 до 35.9 мкг С/экз./сут), а рацион АS –

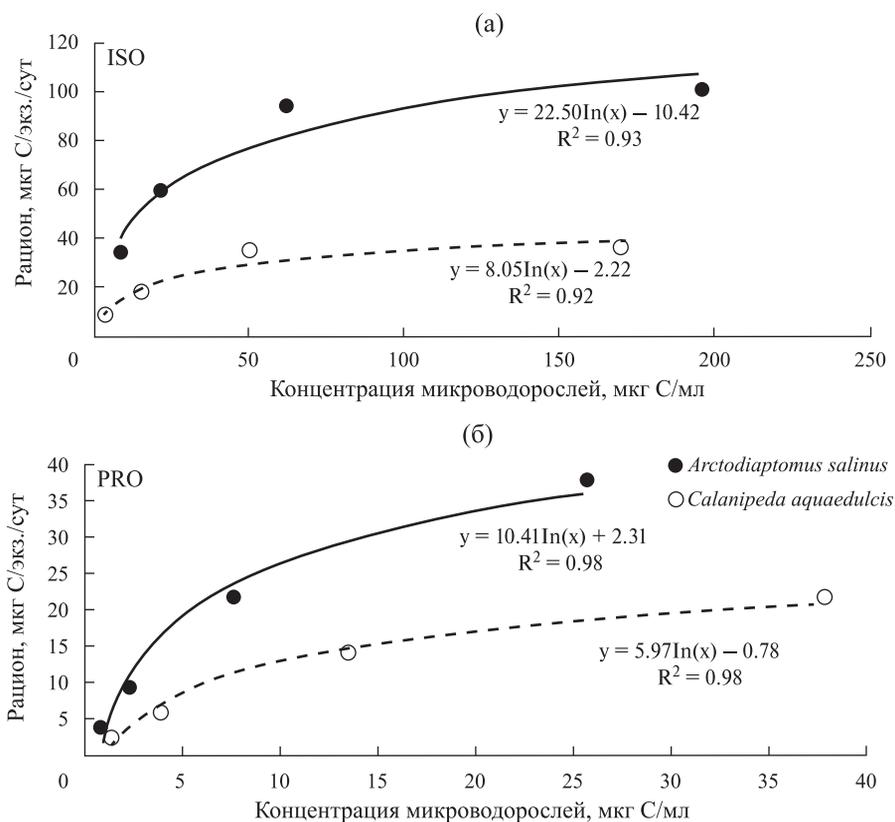


Рис. 1. Углеродный эквивалент рационов *Calanipeda aquaedulcis* и *Arctodiaptomus salinus* (G, мкг С/экз./сут) в зависимости от концентрации микроводорослей (мкг С/мл). а – *Isochrysis galbana* (ISO), б – *Prorocentrum cordatum* (PRO) (M, 95% CI, $p < 0.05$).

с 1306 до 3894×10^3 кл./экз./сут (от 33.8 до 100.9 мкг С/экз./сут) (рис. 1а, табл. 1, 2). Однако значения G при питании ISO, выраженные в углеродных единицах в процентах относительно массы копепод, оказались сопоставимы для обоих видов и возрастали от 400 до 1400 - 1500% (табл. 1, 2).

Рационы при питании PRO (293 пг С/кл.) в диапазоне концентрации микроводорослей от 1 до 40 мкг С/мл (от 3×10^3 до 1.3×10^3 кл./мл) возрастали до максимальных значений – 21.8 мкг С/экз./сут (CA) и 37.8 мкг С/экз./сут (AS), не выходя на плато (рис. 1б, табл. 1, 2). Суточные рационы копепод, выраженные в углеродных единицах в процентах относительно массы копепод, при питании PRO возрастали по мере возрастания концентрации клеток от ~ 100 до $\sim 900\%$ у CA, и от ~ 50 до $\sim 530\%$ у AS (табл. 1, 2).

EPR более мелкого вида копепод CA возрастала до максимального значения 11 яиц/самка/сут (129% массы тела самки в углеродном эквиваленте) уже при концентрациях ISO 15.4 мкг С/мл (0.6×10^6 кл./мл) и PRO 4 мкг С/мл (13×10^3 кл./мл). Несмотря на дальнейшее повышение рационов,

при возрастании концентрации микроводорослей выше этих критических концентраций, производство яиц самками CA снижалось.

EPR более крупных копепод AS возрастала с 1.7 ± 0.1 до 3.3 ± 0.2 яиц/самка/сут с увеличением концентрации PRO от 3×10^3 до 87×10^3 кл./мл (с 0.9 до 25.6 мкг С/мл), и варьировала от 3.2 ± 0.5 до 4.4 ± 0.6 яиц/самка/сут в диапазоне концентрации ISO (0.3 - 7.6) $\times 10^6$ кл./мл (от 8.9 до 195.9 мкг С/мл) (табл. 2). Максимальные значения EPR для AS (3.3 и 4.4 яиц/самка/сут при питании PRO и ISO составляли 34 и 45% углеродного эквивалента массы тела самок, соответственно).

Эффективность использования потребленной пищи на производство яиц (GGE , %) для CA варьировала в пределах 1.2 – 16.9% при питании ISO и от 11.9 – 51.8% при питании PRO; для AS – 2.5 - 9.5% (ISO), и 6.4 - 34.5% (PRO). Максимальные значения GGE для CA составляли 16.9% (ISO) и 51.8% (PRO), что совпадало с максимальными значениями среднесуточной продукции яиц, соответствующими рационам

Таблица 1. Среднесуточная продукция яиц самками *Calanipeda aquaedulcis* (2.4 мкг С/экз.) при разной концентрации микроводорослей ($M \pm SD$, 95% CI)

Концентрация микроводорослей		Суточные рационы (G)			Среднесуточная продукция яиц (EPR)		Эффективность использования потребленной пищи на производство яиц (GGE, %)
Кл./мл	мкг С/мл	$10^3 \times$ кл./экз./сут	мкг С/экз./сут	мкг С/ мкг С/ сут, %*	Яйца/самка/сут	мкг С/самка/сут	
<i>Isochrysis galbana</i>							
6.6×10^6	170.4	1387	35.9	1494	1.5 ± 0.1	0.4	1.2
2.0×10^6	50.8	1352	35.0	1456	10 ± 0.2	2.8	8.0
0.6×10^6	15.4	706	18.3	760	11 ± 0.2	3.1	16.9
0.2×10^6	4.2	331	8.6	356	4.5 ± 0.4	1.3	14.6
<i>Prorocentrum cordatum</i>							
129×10^3	37.9	74	21.8	905	9.3 ± 0.5	2.6	11.9
46×10^3	13.5	48	14.2	590	10.5 ± 0.9	3.0	20.8
13×10^3	3.9	20	5.8	241	10.7 ± 1.2	3.0	51.8
5×10^3	1.4	8	2.4	98	4.0 ± 0.5	1.1	47.2

*Суточные рационы копепод, выраженные в углеродных единицах в процентах относительно массы копепод.

Таблица 2. Среднесуточная продукция яиц самками *Arctodiaptomus salinus* (7.12 мкг С/экз.) при разной концентрации микроводорослей ($M \pm SD$, 95% CI)

Концентрация микроводорослей		Суточные рационы (G)			Среднесуточная продукция яиц (EPR)		Эффективность использования потребленной пищи на производство яиц (GGE, %)
Кл./мл	мкг С/мл	$10^3 \times$ кл./экз./сут	мкг С/экз./сут	мкг С/ мкг С/ сут, %*	Яйца/самка/сут	мкг С/самка/сут	
<i>Isochrysis galbana</i>							
7.6×10^6	195.9	3894	100.9	1415	4.2 ± 0.6	3.1	3.1
2.4×10^6	61.9	3623	93.8	1317	3.2 ± 0.5	2.3	2.5
0.8×10^6	21.7	2309	60	839	4.3 ± 0.6	3.1	5.2
0.3×10^6	8.9	1306	33.8	475	4.4 ± 0.6	3.2	9.5
<i>Prorocentrum cordatum</i>							
87×10^3	25.6	129	37.8	530	3.3 ± 0.2	2.4	6.4
26×10^3	7.6	74	21.8	306	2.1 ± 0.2	1.5	6.9
8×10^3	2.4	31	9.1	128	2.7 ± 0.2	1.9	21.2
3×10^3	0.9	12	3.5	49	1.7 ± 0.1	1.2	34.5

*Суточные рационы копепод, выраженные в углеродных единицах в процентах относительно массы копепод.

углерода микроводорослей 760 и 240%, полученными при концентрациях 0.6×10^6 кл./мл (15.4 мкг С/мл) ISO и 13×10^3 кл./мл (3.9 мкг С/мл) PRO. Максимальные значения GGE для AS (9.5 и 34.5%) соответствовали рационам (в процентах от углеродного эквивалента тела копепод) 49 и 475%, зарегистрированным при концентрациях микроводорослей 0.3×10^6 кл./мл (8.9 мкг С/мл) ISO и 3×10^3 кл./мл (0.9 мкг С/мл) PRO.

ОБСУЖДЕНИЕ

Трофические условия, в которых находятся копеподы, влияют как на их рацион, так и на воспроизводство. На скорость потребления корма копеподами и на связанную с питанием

скорость продукции яиц оказывают влияние как качество (размеры, морфология, связанный с таксономией биохимический состав), так и количество потребленных микроводорослей. Как показали наши исследования, таксономический статус и, соответственно, размеры и состав микроводорослей, безусловно, влияют на характер питания и репродуктивные характеристики самок каланоидных копепоид *Calanipeda aquaedulcis* и *Arctodiaptomus salinus*.

Считается, что продуцирование качественных жизнеспособных яиц каланоидными копеподами связано с наличием и усвоением некоторых полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), в частности, высоконенасыщенных эйкозапентаеновой (ЭПК, 20:5n3) и докозагексаеновой (ДГК, 22:6n3) (Lacoste et al., 2001). Используемые нами в экспериментах *Isochrysis galbana* и *Prorocentrum cordatum* относятся к оптимальным для воспроизводства не только обоих видов солоноватоводных (Аганесова, 2021), но и морских копепоид рода *Acartia* (Ханайченко, 1999; Støttrup, Jensen, 1990) и рода *Calanus* (Lacoste et al., 2001). Оба вида микроводорослей содержат достаточное количество ЭПК и ДГК: 14% ЭПК и 28% ДГК от общего количества жирных кислот в составе *P. cordatum* и 10.3% ЭПК и 34% ДГК в составе *I. galbana* (Suh et al., 2015).

Общие тенденции в питании копепоид СА и АS микроводорослями во многом сходны с таковыми морских каланоидных копепоид с близкими размерными характеристиками. Суточные рационы СА и АS оказались сопоставимы с рационами близких им по размеру копепоид рода *Acartia* при питании микроводорослями при такой же температуре. При сходных концентрациях динофлагеллят *P. cordatum* ($8-13 \times 10^3$ кл./мл) суточный рацион копепоиды *Acartia clausi* составлял 5×10^4 кл./экз./сут (Ковалева, 1977), а *A. tonsa* — 4×10^4 кл./экз./сут (Besiktepe, Dam, 2020), что сопоставимо с полученными в наших экспериментах рационами СА (2×10^4 кл./экз./сут) и АS (3×10^4 кл./экз./сут).

Удельные суточные рационы, выраженные в процентном отношении к углеродному эквиваленту тела копепоид рода *Acartia*, при высоких концентрациях микроводорослей часто превышают 100% углерода тела копепоид (Durbin, Durbin, 1992) и достигают 360% (Paffenhöffer, 1988) и 570% (Besiktepe, Dam, 2020) у *A. tonsa*, а

также 660% у *A. hudsonica* (Deason, 1980). В наших экспериментах удельные суточные рационы при питании *P. cordatum* достигали ~ 530% углеродного эквивалента массы АS и ~ 900% СА.

При высоких концентрациях микроводорослей не наблюдалось значимой корреляции между рационом и скоростью продукции яиц копеподами. Несмотря на высокие рационы, они демонстрировали невысокую скорость продукции яиц, свойственную этим видам. Максимум *EPR* СА составлял приблизительно 11 яиц/самка/сут (129% углерода от массы тела самки) при концентрациях ISO 15.4 мкг С/мл (0.6×10^6 кл./мл) и PRO 3.9 мкг С/мл (13.3×10^3 кл./мл). Превышение этих концентраций приводило к снижению *EPR*. Максимальные значения *EPR* АS — 3.3 и 4.4 яиц/самка/сут (45 и 34% углеродного эквивалента массы самки), получены при концентрациях ISO от 8.9 мкг С/мл (0.3×10^6 кл./мл) и PRO от 25.6 мкг С/мл (87×10^3 кл./мл), соответственно. Максимумы *EPR*, полученные в нашем исследовании, согласуются с максимальными значениями для СА (~10 яиц/самка/сут) и ~ 3.5 яйца/самка/сут для АS) (Аганесова, 2021). Близкие *EPR* АS были получены в оптимальных условиях проточного культивирования (~ 2.7 яйца/самка/сут) (Tolomeev, 2002). Низкие максимальные скорости продукции яиц изученных нами солоноватоводных копепоид по сравнению с морскими планктонными каланоидными копеподами, откладывающими яйца в воду, по-видимому, компенсируются более высокой выживаемостью науплиусов в связи с вынашиванием яиц самкой в яйцевых мешках, и более высокой выживаемостью СА и АS на протяжении более длительного жизненного цикла (Аганесова, 2021).

Эффективность использования потребленной пищи на производство яиц (*GGE*) АS и СА оказалась сходной с *GGE* морских каланоидных копепоид, откладывающих яйца непосредственно в воду, например, таких как *A. tonsa*. При суточном рационе 11.5 мкг С/экз./сут PRO (340% углеродной массы тела самок), *GGE* *A. tonsa* составляла ~ 30% (Besiktepe, Dam, 2020). При суточном рационе ISO > 320% углеродной массы тела самок, *GGE* *A. tonsa* составляла 24% (Støttrup, Jensen, 1990).

У самок СА максимальные значения *GGE* составляли 16.9% при питании ISO и 51.8% при

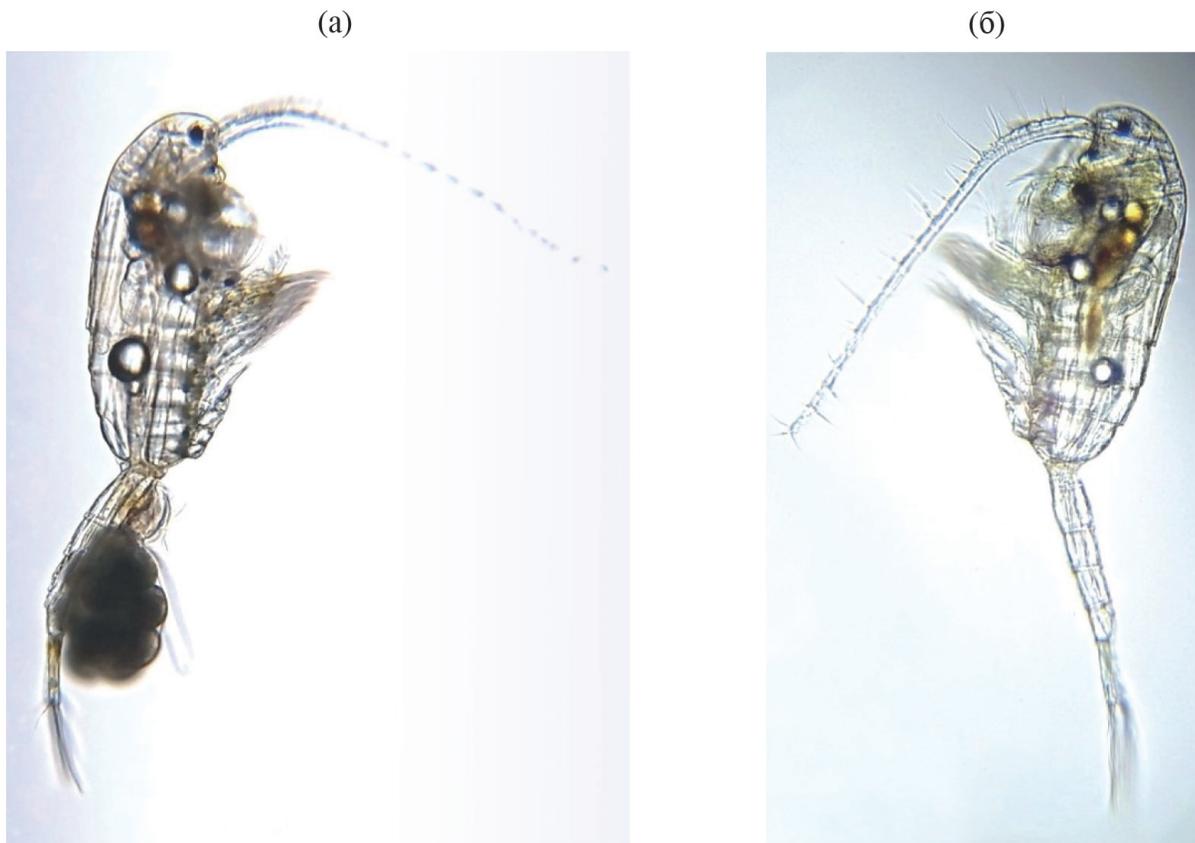


Рис. 2. Самка (а) и самец (б) *Calanipeda aquaedulcis* с жировыми каплями после избыточного кормления микроводорослями (Фото Л.С. Светличного).

питании PRO при рационах 760 и 241% углеродной массы их тела, и совпадали с условиями, при которых были получены максимальные *EPR*. Максимальные значения *GGE* копепоиды AS оказались значимо ниже, чем у СА (9.5% при суточном рационе 475% на ISO и 34.5% при рационе 49% на PRO), в то время как максимумы *EPR* были получены при более высоких концентрациях и рационах.

Эффективность использования пищи на производство яиц определяет эффективность переноса энергии по трофическим уровням. В условиях низкой концентрации энергия потребленных микроводорослей расходуется исключительно на обмен и двигательную активность копепоид. Возрастание концентрации пищи до критической, обеспечивающей все потребности копепоид, включая метаболизм и максимально возможную для вида скорость генеративной продукции, приводит к избыточному питанию, при котором скорость производства яиц сначала выходит на плато, а затем, даже при возрастании рационов, снижается.

Избыточное питание копепоид снижает эффективность использования пищи на генеративную продукцию и приводит к аккумуляции жира в виде липидных капель в теле копепоид (рис. 2), которые в дальнейшем при недостатке пищи могут использоваться для поддержания метаболизма.

Удельные рационы, скорость продукции яиц и эффективность использования пищи на генеративную продукцию у СА оказались значительно выше, чем у AS, независимо от вида микроводоросли. Очевидно, это является подтверждением более высокого уровня метаболизма мелкоразмерного вида копепоид, так как ранее показано, что удельная скорость потребления кислорода у СА вдвое выше по сравнению с AS (Svetlichny et al., 2012b).

Известно, что основными запасными веществами у AS являются триацилглицериды, в которых доминируют высоконасыщенные жирные кислоты при варьирующем процентном соотношении от 3.0/0.3 до 12.4/17.8 докозагексаеновой (ДГК, 22:6n3) и эйкозапентаеновой

(ЭПК, 20:5n3) кислот (Tolomeev et al., 2010). В составе самок AS из морских эстуариев обнаруживали до 20-22% ЭПК и 10-12% ДГК (Guerrero et al., 2007), в то время как в составе СА присутствовали преимущественно мононенасыщенные жирные кислоты и только следы ПНЖК (Gonçalves et al., 2012). Редко находили до 7% ЭПК и до 9% ДГК (Vincent, Ceccaldi, 1988).

Каланоидные копеподы имеют ограниченную способность к синтезу высоконенасыщенных жирных кислот, таких как ДГК и ЭПК, и вариабельность их жирнокислотного состава в значительной степени определяется различиями жирнокислотного состава микроводорослей, которыми они питаются. Анализ эффективности использования разных высоконенасыщенных жирных кислот при питании разными видами микроводорослей на производство яиц копеподами показал, что *GGE* по ДГК остается всегда выше *GGE* по ЭПК (Helenius et al., 2020). Поэтому очевидно, содержание и соотношение этих двух ненасыщенных жирных кислот в составе микроводорослей является одним из основных факторов, оказывающих влияние на репродуктивные характеристики каланоидных копепод. Возможно, различия в содержании высоконенасыщенных жирных кислот могут объяснить более высокие значения *GGE PRO* по сравнению с *ISO* при более низких концентрациях пищи.

Копеподы имеют видоспецифичные соотношения разных классов каротиноидов, которые оказывают различную степень антиоксидантной защиты по отношению к разным ненасыщенным жирным кислотам (Vincent, Ceccaldi, 1988). Ранее нами было обнаружено, что в одинаковых трофических условиях при более высоком суммарном содержании каротиноидов у AS в составе его каротиноидов доминировал этерифицированный астаксантин (62.5%), а в составе СА – его свободная форма (47.5%) (Ханайченко и др., 2014).

Различия в эффективности использования потребленной пищи на производство яиц, в жирнокислотном и каротиноидном составе копепод СА и AS связаны с особенностями биологии, метаболизма и стратегии размножения видов. Для выживания СА важна скорость производства яиц без включения диапаузирующих стадий, а для AS необходимо накопление

определенных незаменимых компонентов, обеспечивающих выживаемость потомства в экстремальных условиях.

Пищевые сети планктонных копепод играют важную роль в глобальном цикле переноса органического углерода на более высокие трофические уровни. Понимание роли конкретных видов копепод в конвертировании углерода из потребленной пищи в их генеративную продукцию имеет большое значение для прогнозирования изменений в функционировании водных экосистем.

ВЫВОДЫ

Рационы обоих видов копепод увеличивались логарифмически с возрастанием концентрации микроводорослей. Максимальные суточные рационы копепод при питании *Isochrysis galbana* с концентрацией 170-196 мкг С/мл составили 1.4×10^6 кл./экз./сут или 1500% углерода тела *Calanipeda aquaedulcis* и 3.9×10^6 кл./экз./сут или 1400% углерода тела *Arctodiaptomus salinus*. Максимальные суточные рационы копепод при питании *Prorocentrum cordatum* с концентрацией 26-38 мкг С/мл составили 7.4×10^4 кл./экз./сут или 900% углерода тела *C. aquaedulcis* и 12.9×10^4 кл./экз./сут или 530% углерода тела *A. salinus*.

EPR у самок *C. aquaedulcis* была максимальной (11 яиц/самка/сут, 129% массы тела самки в углеродном эквиваленте) при концентрациях *I. galbana* 15.4 мкг С/мл (0.6×10^6 кл./мл) и *P. cordatum* 4 мкг С/мл (13×10^3 кл./мл). Выше этих критических концентраций производство яиц снижалось, несмотря на возрастание рациона.

EPR у самок *A. salinus* возростала до 3.3 яиц/самка/сут (34% углеродного эквивалента массы самки) при концентрации *P. cordatum* 87×10^3 кл./мл (26 мкг С/мл), и до 4.4 яиц/самка/сут (45% углеродного эквивалента массы самки) при концентрации *I. galbana* 8.9 мкг С/мл (0.3×10^6 кл./мл). Рацион питания копеподы *A. salinus* (при питании *I. galbana*) выше 475% углеродного эквивалента массы тела не приводил к увеличению скорости продукции яиц.

GGE были значимо ниже у *A. salinus* по сравнению с *C. aquaedulcis* – максимум 9.5% по сравнению с 16.9% при питании *I. galbana*, и максимум 34.5% и 51.8% при питании *P. cordatum*.

Максимальные значения *GGE* у *C. aquaedulcis* совпадали с максимальными значениями *EPR* и с относительными углеродными рационами 760 и 240% при питании *I. galbana* и *P. cordatum*, соответственно. Максимальные значения *GGE* у самок *A. salinus* были получены при питании *I. galbana* и *P. cordatum* (475 и 49% соответственно).

Максимальные значения суточного рациона (в углеродном эквиваленте), плодовитости и эффективности использования пищи на генеративную продукцию у *C. aquaedulcis* оказались значимо выше, чем у *A. salinus*, и не зависели от вида и концентрации микроводорослей, указывая на более высокий уровень метаболизма мелкоразмерной копеподы *C. aquaedulcis*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность в.н.с., к.б.н. В.С. Муханову за предоставление данных по концентрации клеток микроводорослей методом проточной цитометрии и всестороннюю помощь и поддержку при написании рукописи, а также двум рецензентам за ценные замечания и предложения, которые способствовали улучшению рукописи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме “Комплексное исследование механизмов функционирования морских биотехнологических комплексов с целью получения биологически активных веществ из гидробионтов” (№ гос. регистрации 124022400152-1).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека и животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Аганесова Л.О. Длительность развития копепод *Calanipeda aquaedulcis* и *Arctodiaptomus salinus* при разном температурном режиме культивирования // Мор. экол. журн. 2013. Т. 12. № 1. С. 19–25.

Аганесова Л.О. Размножение и развитие солоноватоводных копепод при кормлении микроводорослями разных видов // Биол. моря. 2021. Т. 47. № 2. С. 108–114. doi: 10.31857/S0134347521020029

Вьюшкова В.П., Гурова Т.В. Находка солоноватоводного рачка *Calanipeda aquaedulcis* Krietsch (Copepoda, Calanoidae) в Волгоградском водохранилище // Зоол. журн. 1968. Т. 47. № 11. С. 1726–1727.

Гарбер Б.И. Наблюдения за развитием и размножением *Calanipeda aquae dulcis* Krietsch (Copepoda: Calanoida) // Тр. Карадаг. биол. ст. 1951. Т. 2. С. 3–55.

Гулько А.Ф., Алдакимова А.Я. Материалы о питании *Calanipeda aquaedulcis* (Crustacea, Calanoida) в Азовском море // Тр. АЗНИИРХ. 1963. Вып. 6. С. 3–5.

Ковалева Т.М. Влияние размеров и морфологических особенностей водорослей на потребление их копеподами // Биол. моря. 1977. Т. 42. С. 28–33.

Кортунова Т.А., Буляева Л.Ф., Ярыгина О.К. Рачок калянипеда в Аральском море // Рыб. хоз-во. 1972. № 7. С. 32–34.

Куделина Е.Н. Влияние температуры на размножение, развитие и плодовитость *Calanipeda aquaedulcis* Krietsch // Тр. Касп. бассейн. фил. ВНИРО. 1950. Т. 11. С. 265–286.

Ханайченко А.Н. Влияние микроводорослевой диеты на характеристики воспроизводства копепод // Экол. моря. 1999. Т. 49. С. 56–61.

Ханайченко А.Н., Поспелова Н.А., Аганесова Л.О., Рауэн Т.В. Каротиноидный состав каляноидных копепод *Calanipeda aquaedulcis* и *Arctodiaptomus salinus* при питании *Dunaliella salina* // Мор. экол. журн. 2014. Т. 13. № 1. С. 82–87.

Шадрин Н.В., Батогова Е.А., Конейка А.В. *Arctodiaptomus salinus* (Daday, 1885) (Copepoda, Diaptomidae), редкий в северо-западной части Черного моря вид, обычен в прибрежных водах Крыма // Мор. экол. журн. 2008. Т. 7. № 2. С. 86.

Andreev N.I., Plotnikov I.S., Aladin N.V. The fauna of the Aral Sea in 1989. 2. The zooplankton // Int. J. Salt Lake Res. 1992. V. 1. № 1. P. 111–116. doi: 10.1007/bf02904955

Barkhatov Y.V., Tolomeev A.P., Drobotov A.V. The response of zooplankton abundance in saline meromictic Lake Shira to a change in circulation regime // J. Ocean. Limnol. 2023. V. 41. P. 1321–1330. doi 10.1007/s00343-022-2132-z

Berggreen U., Hansen B., Kiørboe T. Food size spectra, ingestion and growth of the copepod *Acartia tonsa* during development: implications for determination of copepod production // Mar. Biol. 1988. V. 99. № 3. P. 341–352. doi: 10.1007/bf02112126

- Besiktepe S., Dam H.G.* Effect of diet on the coupling of ingestion and egg production in the ubiquitous copepod // *Acartia tonsa*, Prog. Oceanogr. 2020. V 186. Art. ID 102346. doi: 10.1016/j.pocean.2020.102346
- Brucet S., Compte J., Boix D. et al.* Feeding of nauplii, copepodites and adults of *Calanipeda aquaedulcis* (Calanoida) in Mediterranean salt marshes // Mar. Ecol.: Prog. Ser. 2008. V. 355, P. 183–191. doi 10.3354/meps07225
- Coutteau P.* Micro-Algae / Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture, FAO Fisheries Technical Paper, № 361, P. Lavens, P. Sorgeloos, Eds., Rome: FAO. 1996. P. 7–48.
- Dam H.G., Colin S.P.* *Prorocentrum minimum* (clone Exuv) is nutritionally insufficient, but not toxic to the copepod *Acartia tonsa* // Harmful Algae. 2005. V. 4. P. 575–584. doi: 10.1016/j.hal.2004.08.007
- Deason E.E.* Grazing of *Acartia hudsonica* (*A. clausi*) on *Skeletonema costatum* in Narragansett Bay (USA): Influence of food concentration and temperature // Mar. Biol. 1980. V. 60. P. 101–113. doi: 10.1007/BF00389153
- Durbin E.G., Durbin A.G.* Effects of temperature and food abundance on grazing and short term weight change in the marine copepod *Acartia hudsonica* // Limnol. Oceanogr. 1992. V. 37. № 2. P. 361–378. doi: 10.4319/lo.1992.37.2.0361
- Frisch D., Rodríguez-Pérez H., Green A.J.* Invasion of artificial ponds in Donana Natural Park, southwest Spain, by an exotic estuarine copepod // Aquat. Conserv. 2006. V. 16. № 5. P. 483–492. doi 10.1002/aqc.718
- Frost B.W.* Effects of size and concentration of food particles on the feeding behavior of the marine planktonic copepod *Calanus pacificus* // Limnol. Oceanogr. 1972. V. 18. № 6. P. 805–815. doi 10.4319/lo.1972.17.6.0805
- Gonçalves A.M.M., Azeiteiro U.M., Pardal M.A., De Troch M.* Fatty acid profiling reveals seasonal and spatial shifts in zooplankton diet in a temperate estuary // Estuarine, Coastal Shelf Sci. 2012. V. 109. P. 70–80. doi: 10.1016/j.ecss.2012.05.020
- Gubanova A.D., Prusova I.Yu., Niermann U. et al.* Dramatic change in the copepod community in Sevastopol Bay (Black Sea) during two decades (1976–1996) // Senckenbergiana Maritima. 2001. V. 31. № 1. P. 17–27. doi: 10.1007/bf03042833
- Guerrero F., Jiménez-Melero R., Parra G. et al.* Lipid composition of *Arctodiaptomus salinus* (Copepoda: Calanoida) // J. Freshwater Ecol. 2007. V. 22. № 1. P. 147–150. doi: 10.1080/02705060.2007.9664155
- Gurkan S., Aragoneses P., Innal D. et al.* Trophic niches of two congeneric pipefishes in the Aegean Sea (Bargilya Wetland, Turkey), based on stable isotope analyses // Preprint. 2023. № 2023072072. doi: 10.20944/preprints202307.2072.v1
- Helenius L., Budge S.M., Johnson C.L.* Stable isotope labeling reveals patterns in essential fatty acid growth efficiency in a lipid-poor coastal calanoid copepod // Mar. Biol. 2020. V. 167. Art. ID 178. doi: 10.1007/s00227-020-03794-8
- Jiménez-Melero R., Parra G., Guerrero F.* Effect of temperature, and individual variability on the embryonic development time and fecundity of *Arctodiaptomus salinus* (Copepoda: Calanoida) from a shallow saline pond // Hydrobiologia. 2012. V. 686. P. 241–256. doi: 10.1007/s10750-012-1014-3
- Jiménez-Melero R., Parra G., Souissi S., Guerrero F.* Post-embryonic developmental plasticity of *Arctodiaptomus salinus* (Copepoda: Calanoida) at different temperatures // J. Plankton Res. 2007. V. 29. № 6. P. 553–567. doi: 10.1093/plankt/fbm038
- Khanaychenko A.N., Telesh I.V., Skarlato S.O.* Bloom-forming potentially toxic dinoflagellates *Prorocentrum cordatum* in marine plankton food webs // Protistology. 2019. V. 13. № 3. P. 95–125. doi: 10.21685/1680-0826-2019-13-3-1
- Kjørboe T., Sabatini M.* Reproductive and life cycle strategies in egg-carrying cyclopoid and free-spawning calanoid copepods // J. Plankton Res. 1994. V. 16. № 10. P. 1353–1366. doi 10.1093/plankt/16.10.1353
- Lacoste A., Poulet S.A., Cueff A. et al.* New evidence of the copepod maternal food effects on reproduction // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2001. V. 259. № 1. P. 85–107. doi: 10.1016/S0022-0981(01)00224-6
- Lapesa S., Snell T.W., Fields D.M., Serra M.* Selective feeding of *Arctodiaptomus salinus* (Copepoda, Calanoida) on co-occurring sibling rotifer species // Freshwater Biol. 2004. V. 49. № 8. P. 1053–1061. doi: 10.1111/j.1365-2427.2004.01249.x
- Lazareva V.I.* The Mediterranean copepod *Calanipeda aquaedulcis* Kritschagin, 1873 (Crustacea, Calanoida) in the Volga River Reservoirs // Inland Water Biol. 2018. V. 11. P. 303–309. doi 10.1134/S1995082918030112
- Marrone F., Castelli G., Barone R., Naselli-Flores L.* Ecology and distribution of calanoid copepods in Sicilian inland waters (Italy) // Verh. – Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. 2006. V. 29. P. 2150–2156. doi: 10.1080/03680770.2006.11903072
- Paffenhöffer G.-A.* Feeding rates and behavior of zooplankton // Bull. Mar. Sci. 1988. V. 43. № 3. P. 430–445.

- Plotnikov I.S., Aladin N.V., Mossin J., Høeg J.T. Crustacean fauna of the Aral Sea and its relation to ichthyofauna during the modern regression crisis and efforts at restoration // *Zool. Stud.* 2021. V. 60. № 25. doi: 10.6620/ZS.2021.60-25
- Ramdani M., Elkhiafi N., Flower R.J. et al. Open water zooplankton communities in North African wetland lakes: the CASSARINA Project // *Aquatic Ecol.* 2001. V. 35. № 3–4. P. 319–333. doi: 10.1023/A:1011926310469
- Rokneddine A., Chentoufi M. Study of salinity and temperature tolerance limits regarding four crustacean species in a temporary salt water swamp (Lake Zima, Morocco) // *Anim. Biol.* 2004. V. 54. № 3. P. 237–253. doi: 10.1163/1570756042484719
- Støttrup J.G., Jensen J. Influence of algal diet on feeding and egg-production of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1990. V. 141. № 2–3. P. 87–105. doi: 10.1016/0022-0981(90)90216-Y
- Svetlichny L., Hubareva E., Khanaychenko A. *Calanipeda aquaedulcis* and *Arctodiaptomus salinus* are exceptionally euryhaline osmoconformers: Evidence from mortality, oxygen consumption, and mass density patterns // *Mar. Ecol.: Prog. Ser.* 2012a, V. 470. P. 15–29. doi: 10.3354/meps09907
- Svetlichny L., Khanaychenko A., Hubareva E., Aganesova L. Partitioning of respiratory energy and environmental tolerance in the copepods *Calanipeda aquaedulcis* and *Arctodiaptomus salinus* // *Estuarine, Coastal Shelf Sci.* 2012b. V. 114. P. 199–207. doi: 10.1016/j.ecss.2012.07.023
- Suh S.S., Kim S.J., Hwang J. et al. Fatty acid methyl ester profiles and nutritive values of 20 marine microalgae in Korea // *Asian Pac. J. Trop. Med.* 2015. V. 8. № 3. P. 191–196. doi: 10.1016/S1995-7645(14)60313-8
- Tolomeev A.P. Phytoplankton diet of *Arctodiaptomus salinus* (Copepoda, Calanoida) in Lake Shira (Khakasia) // *Aquat. Ecol.* 2002. V. 36. № 2. P. 229–234.
- Tolomeev A.P., Sushchik N.N., Gulati R.D. et al. Feeding spectra of *Arctodiaptomus salinus* (Calanoida, Copepoda) using fatty acid trophic markers in seston food in two salt lakes in South Siberia (Khakasia, Russia) // *Aquat. Ecol.* 2010. V. 44. № 3. P. 513–530. doi: 10.1007/s10452-010-9331-y
- Ustaoglu M.R. A check-list for zooplankton of Turkish inland waters // *Eur. Union J. Fish. Aquat. Sci.* 2004. V. 21. № 3–4. P. 191–199.
- Vincent M., Ceccaldi H.J. Relations entre acides gras et pigments caroténoïdes chez un crustacé copépode, *Calanipeda aquae-dulcis* // *Biochem. Syst. Ecol.* 1988. V. 16. № 3. P. 317–324. doi: 10.1016/0305-1978(88)90017-8

Effect of Microalgae Species and Concentration on Grazing Rate and Egg Production of Copepods *Calanipeda aquaedulcis* Kritschagin, 1873 and *Arctodiaptomus salinus* (Daday, 1885)

L. O. Aganesova^a, A. N. Khanaychenko^a

^a*Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol 299011, Russia*

The effect of concentration of the microalgae, haptophyte *Isochrysis galbana* and dinophyte *Prorocentrum cordatum*, on the daily grazing rate (*G*) and daily egg production rate (*EPR*) of the brackish-water copepods *Arctodiaptomus salinus* and *Calanipeda aquaedulcis* was studied under experimental conditions. Daily grazing rates of copepods increased logarithmically with increasing microalgae concentration. The maximum grazing rates in both species were observed when feeding on *I. galbana* at a concentration of 170–196 µg C/mL. The maximum daily *EPR* in females of *C. aquaedulcis* (129% of body weight in carbon equivalent) were obtained when they fed on *I. galbana* at a concentration of 15.4 µg C/mL, or on *P. cordatum* at 4 µg C/mL. The maximum *EPR* values in *A. salinus* females were 34% of their weight in carbon equivalent when feeding on *P. cordatum* at a concentration of 26 µg C/mL, and 45% in their carbon equivalent at 8.9 µg C/mL of *I. galbana*. The further increase in the microalgae concentration led to the decrease in *EPR* values. The efficiency of ingested food utilization for egg production in carbon equivalent (gross growth efficiency, *GGE*, %) of *C. aquaedulcis* was significantly higher than that of *A. salinus*, regardless of the species and concentration of microalgae.

Keywords: copepods, *Arctodiaptomus salinus*, *Calanipeda aquaedulcis*, grazing rate, egg production rate

УДК 577.47:170.49

СОДЕРЖАНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В МОРСКОЙ ТРАВЕ *ZOSTERA MARINA* LINNAEUS, 1753 В БУХТЕ ВОЕВОДА (АМУРСКИЙ ЗАЛИВ, ЯПОНСКОЕ МОРЕ)

© 2024 г. А. А. Рюмина¹, * (ORCID: 0000-0002-1740-6029),
П. Я. Тищенко¹ (ORCID: 0000-0002-3500-2861), Е. М. Шкирникова¹ (ORCID: 0000-0003-2380-1049),
Ю. А. Барабанщиков¹ (ORCID: 0000-0002-0922-5500)

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

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

Поступила в редакцию 20.04.2023 г.

После доработки 29.11.2023 г.

Принята к публикации 24.01.2024 г.

В работе были проанализированы концентрации тяжелых металлов в живых и отмерших листьях, стеблях, корневищах и корнях морской травы *Zostera marina* Linnaeus, 1753. Металлы по концентрации располагались в ряду Fe > Mn > Zn > Cu > Pb > Ni > Cd. Обнаружена разница в содержании Fe, Pb, Ni и Cd в живых и отмерших листьях. Рассчитан фактор обогащения донных осадков тяжелыми металлами из отмерших листьев, который изменялся в ряду Cu > Pb > Zn > Ni > Mn. В этом же ряду изменялся показатель произведения растворимости [-lg(ПП)] сульфидов перечисленных металлов.

Ключевые слова: *Zostera marina*, тяжелые металлы, б. Воевода, Амурский залив

DOI: 10.31857/S0134347524030055

Среди загрязняющих веществ, поступающих в окружающую среду, тяжелые металлы (ТМ) неизменно остаются одной из ведущих групп. В водную среду металлы попадают с атмосферными осадками, химическим выветриванием горных пород, вымыванием сорбционных форм из почв, с поверхностным стоком и со сточными (промышленными, сельскохозяйственными, хозяйственно-бытовыми) водами. Кроме того, загрязнение могут вызывать танкеры, перевозящие нефть и нефтепродукты, а также другие суда (Христофорова и др., 2015). ТМ считаются серьезными загрязнителями из-за их токсичности, устойчивости в окружающей среде и способности накапливаться в организмах.

Способность к биоаккумуляции ТМ была установлена для животных (Христофорова и др., 1994; Шулькин, 2004; Goldberg, 1986), водорослей (Христофорова, 1989; Коженкова, 2000; Чернова, Коженкова, 2016; Riosmena-Rodríguez et al., 2010), а также морских трав.

Среди последних *Zostera marina* Linnaeus, 1753 — один из объектов повышенного внимания исследователей как возможный индикатор состояния вод (Шишлова, 2002; Чернова, 2012; Brix, Lyngby, 1984; Schlacher-Hoenlinger, Schlacher, 1998; Govers et al., 2014; Bonanno, Di Martino, 2016; Hosokawa et al., 2016; Lin et al., 2016; Bonanno, Orlando-Bonaca, 2017; Bonanno, Borg, 2018; Arici, Vat, 2020).

Важное достоинство *Z. marina* состоит в том, что она является ключевым элементом экосистемы, оказывающим влияние на состояние многих живых организмов в воде, на границе вода—дно и в верхнем слое донных отложений (Larkum et al., 2006). Морские травы, как и водоросли, извлекают металлы из воды, абсорбируя их листовой пластиной, но в отличие от водорослей имеют развитую корневую систему, с помощью которой они также извлекают металлы из поровой воды, находящейся между частицами донных осадков. Одной из важных особенностей *Z. marina* является ее

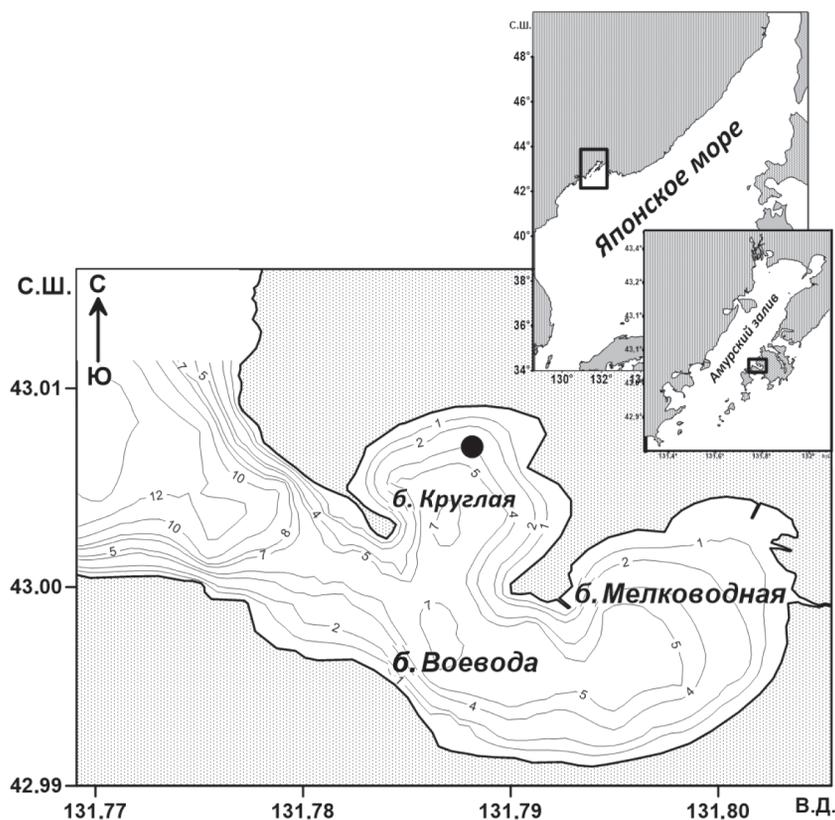


Рис. 1. Карта-схема расположения станции отбора проб в б. Воевода.

чрезвычайно высокая продуктивность (Бергер, 2011; Барабанщиков и др., 2021; McRoy, 1974), которая приводит к обогащению донных отложений органическим веществом (Тищенко и др., 2022). Очевидно, что при столь высокой продуктивности и способности к биоаккумуляции, следует ожидать накопления ТМ в донных осадках, покрытых лугами *Z. marina*. Более того, была установлена линейная зависимость между содержанием органического вещества и концентрацией некоторых ТМ в донных осадках, покрытых морской травой (Рюмина и др., 2023).

Отличительной особенностью донных осадков в б. Воевода является высокое содержание органического вещества и процесс сульфатредукции, проходящий в них (Тищенко и др., 2020; Рюмина и др., 2023).

Цели данной работы: определить концентрацию ТМ (Fe, Mn, Zn, Cu, Pb, Ni, Cd) и органического углерода в разных органах *Z. marina* (живые и отмершие листья, стебли, корневища, корни); оценить возможность обогащения морской травой верхнего слоя донных отложений ТМ. Для

этого были поставлены следующие задачи: отбор проб морской травы и подготовка образцов; выполнение анализов на содержание ТМ и органического углерода; расчет фактора обогащения верхнего слоя донных отложений ТМ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Бухта Воевода располагается в восточной части мористого района Амурского залива (зал. Петра Великого, Японское море), глубоко вдаваясь в западное побережье о-ва Русский (рис. 1). Она состоит из двух мелководных бассейнов – бухт Круглая и Мелководная. Акватория б. Воевода имеет площадь около 4.0 км², Мелководной – около 2.4 км² и Круглой – около 1.6 км². С востока в бухту впадает единственная на острове небольшая р. Русская.

Образцы морской травы отбирали в сентябре 2022 г. в закрытой мелководной части б. Воевода, где были выявлены ее обширные луга (рис. 1). Ранее здесь отбирали керны донных отложений, в которых изучали содержание ТМ и органического углерода (Рюмина и др., 2023).

Водолазы отбирали морскую траву в полиэтиленовые пакеты на глубине около 4 м, промывали морской водой и в чистых полиэтиленовых пакетах доставляли в лабораторию. Траву разделяли на пять категорий: живые листья, отмершие листья, стебли, корневища и корни. Образцы высушивали в сушильном шкафу при температуре 60°C. Растительный материал измельчали, растая в фарфоровой ступке. Подготовку и анализ проб на содержание ТМ осуществляли по методике, опубликованной в работе Брикса и Лингби (Brix, Lyngby, 1982). В коническую колбу объемом 100 мл помещали навеску массой 1 г измельченного растительного материала, дополнительно высушенного до постоянной массы при 105°C. Осторожно, порциями по 5 мл, не допуская сильного вспенивания и разбрызгивания, прибавляли 20 мл концентрированной HNO₃ марки ОСЧ, накрывали часовым стеклом и оставляли на ночь. На следующий день на электроплите, накрытой асбестовым покрывалом, не снимая с колб часовых стекол, осторожно нагревали образцы до осветления раствора. Затем по каплям прибавляли 1 мл H₂O₂ и повторно нагревали примерно в течение часа. Растворы упаривали до влажных солей, добавляли 1 мл дистиллированной воды и упаривали досуха, еще раз добавляли 1 мл воды и снова упаривали. Сухой остаток растворяли в 12 мл 2% азотной кислоты. Содержание ТМ (Fe, Mn, Zn, Cu, Pb, Ni, Cd) в разных органах морской травы определяли пламенным атомно-абсорбционным методом на аппарате AA-3600 (Shimadzu, Япония).

Органический углерод (C_{орг}) в органах *Z. marina* был измерен на анализаторе TOC-VCPN с приставкой для сжигания твердых проб SSM-5000A (Shimadzu, Япония). Принцип действия анализатора основан на измерении поглощения инфракрасного излучения двуокисью углерода, образующейся при сжигании содержащих углерод органических и неорганических соединений. Для определения содержания общего углерода сухие растертые навески осадка сжигали в потоке высокочистого кислорода (99.995%) при 900°C. Для определения содержания неорганического углерода пробы подкисляли ортофосфорной кислотой и сжигали при 200°C. Величину органического углерода рассчитывали по разности общего и неорганического углерода.

Фактор обогащения донных осадков (F_i) ТМ рассчитывали по формуле:

$$F_i = \frac{C_{i(\text{sed})} \times C_{\text{carb}(ZM)}}{C_{\text{carb}(\text{sed})} \times C_{i(ZM)}}, \quad (1)$$

где C_{i(sed)}, C_{i(ZM)} – концентрация металла i в донном осадке (мкг/г) и в отмерших листьях ZM (мкг/г); C_{carb(sed)}, C_{carb(ZM)} – концентрация органического углерода в донном осадке (гС/г) и в отмерших листьях (гС/г) (Булатов, Калинин, 1986; Aytop et al., 2023).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные нами концентрации ТМ и органического углерода в разных органах *Z. marina* представлены в табл. 1. Здесь же приведены концентрации ТМ (мкг/г) в верхнем слое донных осадков (0–5 см) и значения фактора обогащения донных осадков (F_i) ТМ для отмерших листьев.

Отмершие листья и корни морской травы содержали наибольшее количество железа, тогда как стебли – наименьшее. В корневищах и листьях концентрации металла были сопоставимы. Наибольшее содержание марганца зафиксировано в живых и отмерших листьях, а наименьшая концентрация отмечена в стеблях и корневищах. В корнях марганца содержалось значительно меньше, чем в листьях, но больше чем в стеблях и корневищах. Наибольшее количество цинка и меди обнаружено в стеблях и корнях. Значительно меньше этих металлов было в живых и отмерших листьях. Наибольшее содержание свинца зафиксировано в корнях и отмерших листьях. В корневищах, живых листьях и стеблях его концентрация постепенно убывала. Наибольшее содержание никеля наблюдалось в отмерших листьях, в корнях и живых листьях концентрация никеля уменьшалась. Наименьшее его содержание было в стеблях и корневищах. Наибольшая концентрация кадмия зафиксирована в живых листьях (табл. 1).

Фактор обогащения верхнего слоя донных осадков токсичными металлами изменялся от 4.69 (Mn) до 163.1 (Cu) (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение полученных концентраций тяжелых металлов с литературными данными

В табл. 2 представлены фоновые концентрации ТМ в донных осадках (Шулькин, 2004) и

Таблица 1. Содержание тяжелых металлов и органического углерода в разных органах *Zostera marina* и в поверхностном слое донных осадков

Субстрат	Содержание металлов, мкг/г сух. массы							C _{орг} , %	n
	Fe	Mn	Zn	Cu	Pb	Ni	Cd		
Живые листья	101 ± 10	285 ± 3	22.3 ± 1.1	3.0 ± 0.1	2.0 ± 0.5	1.6 ± 0.1	1.2 ± 0.3	35.03	5
Отмершие листья	742 ± 1	245 ± 4	22.7 ± 1.2	3.1 ± 0.03	4.1 ± 0.2	3.2 ± 0.2	0.4 ± 0.2	33.23	3
Стебли	70 ± 4	7.5 ± 0.3	41.3 ± 0.5	4.1 ± 0.8	1.5 ± 0.5	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.1	32.25	5
Корневище	119 ± 2	2.3 ± 0.1	18.0 ± 0.5	1.9 ± 0.6	2.3 ± 0.1	0.7 ± 0.3	0.3 ± 0.1	29.89	4
Корни	500 ± 20	32.8 ± 0.1	38.4 ± 1.7	4.1 ± 0.6	4.3 ± 0.4	1.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	34.43	2
Донные осадки	–	208 ± 3	204 ± 4	91 ± 2	37 ± 2	27 ± 1.5	–	6.01	3

Показатель

-lg[ПР(MeS)]	18.43	15.15	23.35	37.5	28.45	20.52	28.44	–	–
F _i	–	4.69	49.67	163.12	50.01	46.12	–	–	–

Примечание. Указаны средние значения содержания ТМ и стандартное отклонение от среднего. Условные обозначения: n – количество проб в выборке; -lg[ПР(MeS)] – показатель произведения растворимости сульфидов металлов, взятый из Справочника химика (1965); F_i – фактор обогащения донных осадков ТМ для отмерших листьев.

Таблица 2. Фоновые концентрации тяжелых металлов в прибрежных акваториях Японского моря

Субстрат	Fe	Mn	Zn	Cu	Pb	Ni	Cd
1	3.5	350 ± 80	100 ± 10	28 ± 3	35 ± 5	45 ± 5	0.2 ± 0.1
2	1–10	2.6–20	0.5–0.8	0.3–1.2	0.05–0.1	–	0.005–0.04

Примечание. 1 – в донных осадках, где Fe в %, остальные металлы в мкг/г (Шулькин, 2004); 2 – в морской воде в мкг/л (Чернова, Шулькин, 2019).

Таблица 3. Литературные данные по содержанию тяжелых металлов в *Zostera marina* (в мкг/г сух. массы)

Части растения	Район исследования	Металлы							
		Fe	Mn	Zn	Cu	Pb	Ni	Cd	
Молодые листья Старые листья Стебли Корневище Корни	Зал. Восток, Японское море (Шишлова, 2002)	164	732	77.2	6.4	12.8	4.3	2.2	
		331	2118	28.9	4.9	8.4	5.8	3.8	
		505	288	31	5.3	9.4	3.6	1.8	
		663	64.3	21.2	4.6	8.6	2.4	1.4	
		5214	555	29	9.4	17.4	8.5	1.9	
Надземная часть	порт Посьет Мыс Шелеха Мыс Рязанова Мыс Морозова Б. Рейд Паллада Мыс Мраморный (Chernova et al., 2002)	268 ± 24	674 ± 43	31 ± 3.8	5.3 ± 2.1	9.1 ± 0.5	2.7 ± 0.3	2.3 ± 0.1	
		297 ± 81	358 ± 29	26 ± 1.4	3.8 ± 0.7	11.4 ± 4.9	3.5 ± 0.3	1.9 ± 0.1	
		235 ± 13	573 ± 88	25 ± 1.9	5.3 ± 0.1	8.2 ± 0.5	2.3 ± 0.1	1.6 ± 0.2	
		214 ± 16	240 ± 27	21 ± 0.3	2.8 ± 0.2	8.9 ± 4.5	2.3 ± 0.1	2.3 ± 0.1	
Листья	Зал. Петра Великого, Японское море (Чернова, 2012)	23–537	58–925	12.6–35.8	2.3–6.2	–	1.8–4.5	1.1–3.4	
		463–5742	16–142	12.5–40.5	3.5–9.1	–	0.4–5.3	0.5–2.6	
Надземная часть	Б. Онсан Б. Джаран Б. Коджэ, Южная Корея (Lee G et al., 2019)	100.6	198.9	53.9	20.3	1	–	0.6	
		68.9	187.9	26.1	20.8	2.1	–	0.6	
		83.1	174	20.1	17.1	1	–	0.2	
		268.3	13.5	25.6	14.4	0.8	–	0.2	
Подземная часть		291.5	15.7	13.1	12.1	1.5	–	0.5	
		176	10.3	12.9	9.9	0.9	–	0.2	
Надземная часть	Лимфьорд, Дания (Brix, Lyngby, 1984)	80–2990	480–5770	41–175	2.7–10.7	0.5–3.1	–	0.1–2.9	
		101–4080	74–1200	25–125	1.8–5.8	0.4–2.8	–	0.1–0.9	
Живые листья Мертвые листья Стебель Корневище Корни	Лимфьорд, Дания (Lyngby, Brix, 1989)	–	–	107–270	–	2.9–30.4	–	0.3–1.5	
		–	–	148	–	31.4	–	0.5	
		–	–	62	–	2.9	–	0.3	
		–	–	36–90	–	1.5–5.2	–	0.3	
		–	–	134	–	40.6	–	0.6	
Надземная часть	Черноморское побережье Турции (Agić, Vat, 2020)	1719.7	761.8	114.8	13.6	1.9	7.3	0.1	
		4151	444	115.2	14	3.7	11.5	0.03	

морской воде для прибрежных акваторий Японского моря (Чернова, Шулькин, 2019). В литературе содержание ТМ чаще всего приводится для надземной и подземной частей *Z. marina*. Во втором случае рассматриваются все органы морской травы по отдельности. Опубликованные результаты суммированы в табл. 3.

Из табл. 3 следует, что концентрация железа в надземной и подземной частях *Z. marina* изменяется в широком диапазоне. Наименьшее содержание железа соответствует стеблям, а наибольшее – корням и отмершим листьям; живые листья и корневища содержат его промежуточные концентрации. Полученные нами результаты согласуются с данными из зал. Восток Шиловой (2002) не по порядку величины, а по закономерностям содержания железа в органах *Z. marina*.

Полученные нами данные по концентрации марганца также согласуются с литературными данными. Содержание марганца в надземной части *Z. marina*, как правило, выше, в сравнении с подземной частью.

Концентрации цинка и меди, полученные нами для надземной части *Z. marina*, по порядку величины сопоставимы с содержанием этих металлов в *Z. marina*, произрастающей у порта Посьет (Chernova et al., 2002). Также отмечено меньшее содержание этих металлов в корневищах по сравнению с корнями, что согласуется с ранее полученными данными (Шишлова, 2002; Lyngby, Brix, 1989).

Содержание свинца и никеля в корнях *Z. marina* почти в два раза выше, чем в корневище. Такая же картина наблюдается в зал. Восток (Шишлова, 2002). Полученные данные по содержанию свинца в *Z. marina* согласуются с результатами исследования у Черноморского побережья Турции (Arıcı, Vat, 2020), а данные по содержанию никеля – с результатами из порта Посьет (Chernova et al., 2002).

Полученные нами концентрации кадмия согласуются с данными для надземной и подземной частей *Z. marina* из Дании (Lyngby, Brix, 1989) и Южной Кореи (Lee et al., 2019).

Распределение тяжелых металлов в морской траве Zostera marina

Железо. Содержание железа в макрофитах *Z. marina* по сравнению с другими тяжелыми

металлами, как правило, наибольшее (Чернова, Шулькин, 2019). Известно, что гидроксиды железа существуют в морской воде в виде тонких взвешенных частиц (Христофорова, Кобзарь, 2012). Очевидно, что обилие тонкой взвеси, обогащенной Fe, – основная причина резкого возрастания концентрации этого элемента в листьях, особенно в отмерших.

Повышенное содержание железа в корнях (500 ± 20 мкг/г сух. массы) можно объяснить тем, что они находились в непосредственной близости с донными осадками и содержали в себе их маленькие гранулы, не вымывшиеся полностью.

Марганец. Повышенное содержание марганца в листьях может быть связано с тем, что данный элемент входит в состав целого ряда металлоферментов и участвует в процессе фотосинтеза (Шишлова, 2002). Этот факт объясняет его большое количество в живых листьях (285 ± 3 мкг/г сух. массы) и уменьшение содержания в отмерших листьях (245 ± 4 мкг/г сух. массы).

Цинк и медь. Микроэлементы участвуют практически во всех процессах, происходящих в растительной клетке: энергетическом обмене, первичном и вторичном метаболизме, гормональной регуляции и передаче сигнала. Следует также отметить, что 25–50% всех белков работают только в присутствии ионов металлов, из них наибольшее количество (более 1200) функционально связаны с цинком (Титов и др., 2014). Медь – необходимый в качестве микроэлемента участник электрон-транспортной цепи дыхания, процесса фотосинтеза, реакций окисления, метаболизма белков и углеводов (Иванищев, 2020). Наибольшее количество цинка (41.3 ± 0.5 мкг/г сух. массы) и меди (4.1 ± 0.8 мкг/г сух. массы) обнаружено в стеблях, основной функцией которых является транспортировка питательных веществ между корневой системой и листьями. В корнях также присутствует большое количество цинка (38.4 ± 1.7 мкг/г сух. массы) и меди (4.1 ± 0.6 мкг/г сух. массы). Для живых и отмерших листьев нет различий в концентрациях обсуждаемых микроэлементов. Данный факт указывает на то, что эти микроэлементы находятся в воде в основном в растворенном виде, а не во взвешенном состоянии (Христофорова, Кобзарь, 2012).

и поступают в *Z. marina* через корневую систему (Nielsen et al., 2017).

Свинец. Характер распределения свинца в органах и тканях растения сходен с распределением железа. Оба эти элемента в воде находятся во взвешенном состоянии, легко осаждаются и накапливаются в грунте, поэтому они аккумулируются преимущественно корневищами *Z. marina* и мертвыми листьями (Шишлова, 2002). Такие же результаты наблюдаются с никелем. При исследовании роли разлагающихся листьев в накоплении поверхностными донными осадками металлов было установлено, что наличие эпифитов на листьях *Z. marina* приводит к увеличению содержания свинца (Hosokawa et al., 2016). Такая же картина наблюдалась в нашем исследовании. Предполагается, что накопление свинца в разлагающихся листьях может происходить за счет их фрагментации беспозвоночными, что увеличивает площадь поверхности листьев (Schaller et al., 2010), а развитие биопленки приводит к концентрированию металлов (Schaller et al., 2011). Авторы придерживаются точки зрения, что водная толща служит источником металлов при их накоплении в разложившихся листьях.

Никель. Известно, что никель обладает способностью к адсорбции разными минералами, например, сульфидами и оксигидроксидами марганца и железа (Kaushik et al., 2021). Вследствие этого никель может соосаждаться вместе с железом и “налипать” на листья *Z. marina*. Этим мы объясняем высокое содержание этого металла в листьях, особенно в отмерших.

Кадмий. Показано, что при разложении эпифитонами листьев морской травы, содержание кадмия в листьях уменьшалось (Hosokawa et al., 2016). Уменьшение содержания кадмия в разлагающихся листьях свидетельствует о более сильном выщелачивании, чем о накоплении, несмотря на то, что эти металлы накапливаются в листьях в пресноводных условиях (Schaller et al., 2010). Кроме того, известно, что по сравнению с медью и свинцом, кадмий находится в относительно низкой концентрации в растворенных органических веществах, содержащих гуминовые кислоты (Mantoura et al., 1978; Tipping et al., 2003). Свойства гуминовых веществ могут обуславливать различные

тенденции в накоплении микроэлементов разлагающимися листьями.

Фактор обогащения донных осадков тяжелыми металлами

Микробиологическая деструкция органического вещества опавших листьев *Z. marina* приводит к увеличению отношения единицы веса металла к единице веса органического вещества, так как металл не улетучивается, а органическое вещество переходит в неорганическую форму, в основном в CO_2 . Таким образом, концентрация металла на единицу органического углерода растёт. Фактор обогащения донных осадков, представленный формулой (1), должен быть одинаков для всех металлов, если происходит единственный процесс – микробиологическая деструкция органического вещества. В действительности, фактор обогащения изменялся от 4.69 (Mn) до 163.1 (Cu) (табл. 1). На наш взгляд, при попадании металлов с остатками органического вещества в донные осадки, они начинают разделяться на две фазы: неподвижную и подвижную. Неподвижная фаза – сульфиды металлов, которые образуются в результате сульфатредукции. Этот процесс возникает при микробиологической деструкции органического вещества в донных осадках в отсутствие кислорода (Тищенко и др., 2020). Подвижная фаза – органические комплексы ТМ. Следует отметить, что фактор обогащения для исследуемых металлов изменялся в ряду $\text{Cu} > \text{Pb} > \text{Zn} > \text{Ni} > \text{Mn}$ (табл. 1). В этом же ряду изменялся показатель произведения растворимости $[-\lg(\text{ПР})]$, взятый из Справочника химика (1965). Очевидно, что доля неподвижной фазы для каждого металла в форме MeS тем выше, чем менее растворим сульфид (CuS). Подвижная фаза в форме органических комплексов может удаляться из донных осадков морскими организмами (детритофагами). Таким образом, в донных осадках происходит накопление одних металлов и удаление других. Очевидно, что удаление подвижной фазы металлов морскими организмами также сопровождается фракционированием.

Причиной этого, на наш взгляд, является конкуренция за место комплексообразователя между ионами металлов, которые перерабатываются морскими организмами вместе

с органическим веществом. По отношению к марганцу, ионы меди, цинка и свинца являются ингибиторами комплексообразования. Менее устойчивые комплексы выделяются морскими организмами в придонную воду (например, марганец), что приводит к вторичному загрязнению вышележащих вод (Yang et al., 2022).

Отмечено, что устойчивость металлоорганических соединений с медью выше, чем с никелем, что сопоставимо с рядом констант устойчивости Ирвинга-Уильямса ($Mn^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+} > Zn^{2+}$), который основан на комплексообразовании с простыми органическими лигандами (Zhang et al., 2019). Из этого ряда следует, что от марганца к меди образуются более устойчивые комплексы с органическими лигандами. Чем выше значение константы устойчивости, тем более прочным является образовавшийся комплекс и тем дольше он задерживается в подвижной форме донных осадков.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят вед. инженера лаборатории гидрохимии ТОИ ДВО РАН Наталью Александровну Середу за всестороннюю поддержку и помощь в проведении лабораторных исследований и обработке результатов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа выполнена за счет средств бюджета Тихоокеанского океанологического института им. В.И. Ильичева ДВО РАН (государственное задание № 121-021500052-9), а также при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-05-00381-а.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Барабанищikov Ю.А., Тищенко П.Я., Семкин П.Ю. и др. Особенности временной изменчивости содержания кислорода в зарослях *Zostera marina* Linnaeus,

1753 в бухте Воевода (Амурский залив, Японское море) // Морск. биол. журн. 2021. Т. 6. С. 3–16.

Бергер В.Я. О продукции zostеры *Zostera marina* Linnaeus, 1753 в Белом море // Биол. моря. 2011. Т. 37. С. 362–366.

Булатов М.И., Калинин И.П. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа. Ленинград: Химия. 1986.

Иванищев В.В. Биоаккумуляция, гомеостаз и токсичность меди в растениях // Изв. ТулГУ, Естественные науки. 2020. Вып. 1. С. 33–41.

Коженкова С.И. Мониторинг состояния прибрежно-морских вод Приморья по содержанию тяжелых металлов в бурых водорослях: Автореф. дис... канд. биол. наук. Владивосток: ИБМ. 2000.

Рюмина А.А., Тищенко П.Я., Шкирникова Е.М. Тяжелые металлы и органический углерод в донных осадках мелководных бухт залива Петра Великого // Геохимия. 2023. Т. 68. doi: 10.31857/S0016752523060080

Справочник химика. М.-Л.: Химия. 1965. Т. 3.

Титов А.Ф., Казнина Н.М., Таланова В.В. Тяжелые металлы и растения. Петрозаводск: Кар. НЦ РАН. 2014.

Тищенко П.Я., Медведев Е.В., Барабанищikov Ю.А. и др. Органический углерод и карбонатная система в донных отложениях мелководных бухт залива Петра Великого (Японское море) // Геохимия. 2020. Т. 65. С. 583–598.

Тищенко П.Я., Шкирникова Е.М., Горячев В.А. и др. Депонированный органический углерод мелководных бухт залива Петра Великого (Японское море) // Геохимия. 2022. Т. 67. С. 1004–1012.

Христофорова Н.К. Биоиндикация и мониторинг загрязнения вод тяжелыми металлами. Ленинград: Наука. 1989.

Христофорова Н.К., Гамаюнова О.А., Афанасьев А.П. Состояние бухт Козьмина и Врангеля (залив Петра Великого, Японское море): динамика загрязнения тяжелыми металлами // Изв. ТИНРО. 2015. Т. 180. С. 179–186.

Христофорова Н.К., Кобзарь А.Д. Бурые водоросли-макрофиты как индикаторы загрязнения вод бухты Рудной тяжелыми металлами // Изв. ТИНРО. 2012. Т. 168. С. 220–231.

Христофорова Н.К., Шулькин В.М., Кавун В.Я. и др. Тяжелые металлы в промысловых и культивируемых моллюсках залива Петра Великого. Владивосток: Дальнаука. 1994.

- Чернова Е.Н. Фоновые концентрации металлов в зоне берега морской из залива Петра Великого и оценка его современного экологического состояния / Современное экологическое состояние залива Петра Великого Японского моря, Владивосток: Изд. дом ДВФУ. 2012. С. 382–396.
- Чернова Е.Н., Коженкова С.И. Определение пороговых концентраций металлов в водорослях-индикаторах прибрежных вод северо-западной части Японского моря // Океанология. 2016. Т. 56. С. 393–402.
- Чернова Е.Н., Шулькин В.М. Концентрации металлов в воде и в водорослях: биоаккумуляционный фактор // Биол. моря. 2019. Т. 45. С. 177–187.
- Шишлова М.А. Зостера морская (*Zostera marina* L.) как индикатор загрязнения среды тяжелыми металлами: Автореф... дис. канд. биол. наук. Владивосток. 2002. 28 с.
- Шулькин В.М. Металлы в экосистемах морских мелководий. Владивосток: Дальнаука. 2004.
- Arici E., Bat L. Sediment-water interactions with eelgrass (*Zostera* spp.) from Sinop shores of the Black Sea // Caspian J. Environ. Sci. 2020. V. 18. № 2. P. 123–130.
- Айтоп Н., Коса Y.C., Şenol S. The importance of using soil series-based geochemical background values when calculating the enrichment factor in agricultural areas // Environ. Geochem. Health. 2023. V. 45. P. 6215–6230.
- Bonanno G., Borg J. Comparative analysis of trace element accumulation in seagrasses *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa*: Biomonitoring applications and legislative issues // Mar. Pollut. Bull. 2018. V. 128. P. 24–31.
- Bonanno G., Di Martino V. Seagrass *Cymodocea nodosa* as a trace element biomonitor: Bioaccumulation patterns and biomonitoring uses // J. Geochem. Explor. 2016. V. 169. P. 43–49.
- Bonanno G., Orlando-Bonaca M. Trace elements in Mediterranean seagrasses: Accumulation, tolerance and biomonitoring. A review // Mar. Pollut. Bull. 2017. V. 125. P. 8–18.
- Brix H., Lyngby J.E. The distribution of cadmium copper, lead and zinc in eelgrass (*Zostera marina* L.) // Sci. Total Environ. 1982. V. 24. P. 51–63.
- Brix H., Lyngby J.E. A survey of metallic composition of *Zostera marina* (L.) in the Limfjord, Denmark // Arch. Hydrobiol. 1984. V. 99. № 3. P. 347–359.
- Chernova E.N., Khristorofova N.K., Vyshkvartsev D.I. Heavy metals in seagrasses and algae of Pos'et Bay, Sea of Japan // Russ. J. Mar. Biol. 2002. V. 28. № 6. P. 387–392.
- Goldberg E.D. The mussel watch concept // Environ. Monit. Assess. 1986. V. 7. P. 91–103.
- Govers L., Lamers L., Bouma T. et al. Seagrasses as indicators for coastal trace metal pollution: A global meta-analysis serving as a benchmark, and a Caribbean case study // Environ. Pollut. 2014. V. 195. P. 210–217.
- Hosokawa S., Konuma S., Nakamura Y. Accumulation of trace metal elements (Cu, Zn, Cd, and Pb) in surface sediment via decomposed seagrass leaves: a mesocosm experiment using *Zostera marina* L. // PLoS One. 2016. V. 11. № 6. art. ID e0157983. doi 10.1371/journal.pone.0157983
- Kaushik H., Ranjan R., Ahmad R. et al. Assessment of trace metal contamination in the core sediment of Ramsar wetland (Kabar Tal), Begusarai, Bihar (India) // Environ. Sci. Pollut. Res. 2021. V. 28. P. 18686–18701.
- Larkum A.W.D., Orth R.J., Duarte C.M. Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation. Netherlands: Springer-Verlag. 2006.
- Lee G., Suonan Z., Kim S.H. et al. Heavy metal accumulation and phytoremediation potential by transplants of the seagrass *Zostera marina* in the polluted bay systems // Mar. Pollut. Bull. 2019. V. 149. P. 1–12.
- Lin H., Sun T., Xue S., Jiang X. Heavy metal spatial variation, bioaccumulation, and risk assessment of *Zostera japonica* habitat in the Yellow River Estuary, China // Sci. Total Environ. 2016. V. 541. P. 435–443.
- Lyngby J.E., Brix H. Heavy metals in eelgrass (*Zostera marina* L.) during growth and decomposition // Hydrobiologia. 1989. V. 176/177. P. 189–196.
- Mantoura R.F.C., Dickson A., Riley J.P. The complexation of metals with humic materials in natural waters // Estuarine Coastal Mar. Sci. 1978. V. 6. № 4. P. 387–408.
- McRoy C.P. Seagrass productivity: carbon uptake experiments in eelgrass, *Zoster Marina* // Aquaculture. 1974. V. 4. P. 131–137.
- Nielsen S.L., Banta G.T., Khan F.R. et al. Copper in the sediment: a major stressor for eelgrass, *Zostera marina* L. // Hydrobiologia. 2017. V. 788. P. 143–155.
- Riosmena-Rodríguez R., Talavera-Sáenz A., Acosta-Vargas B., Garner S.C. Heavy metals dynamics in seaweeds and seagrasses in Bahía Magdalena, B.C.S., México // J. Appl. Phycol. 2010. V. 22. P. 283–291.
- Schaller J., Brackhage C., Mkandawire M., Dudel E.G. Metal/metalloid accumulation/remobilization during aquatic litter decomposition in freshwater: A review // Sci. Total Environ. 2011. V. 409. № 23. P. 4891–4898.
- Schaller J., Weiske A., Mkandawire M., Dudel E.G. Invertebrates control metals and arsenic sequestration

- as ecosystem engineers // *Chemosphere*. 2010. V. 79. № 2. P. 169–173.
- Schlacher-Hoenlinger M.A., Schlacher T.A.* Differential accumulation patterns of heavy metals among the dominant macrophytes of a mediterranean sea-grass meadow // *Chemosphere*. 1998. V. 37. № 8. P. 1511–1519.
- Tipping E., Rieuwerts J., Pan G. et al.* The solid–solution partitioning of heavy metals (Cu, Zn, Cd, Pb) in upland soils of England and Wales // *Environ. Pollut.* 2003. V. 125. P. 213–225.
- Yang F., Tang Y., Mi Y. et al.* Mn (II) sorption on stream sediments sampled in manganese mining area: Dynamics and mechanisms // *Appl. Sci.* 2022. V. 12. № 7. Art. ID 3368. doi 10.3390/app12073368
- Zhang J., Kattner G., Koch B.P.* Interactions of trace elements and organic ligands in seawater and implications for quantifying biogeochemical dynamics: A review // *Earth Sci. Rev.* 2019. V. 192. P. 631–649.

Heavy Metal Content in the Seagrass *Zostera marina* Linnaeus, 1753 in Voevoda Bay (Amur Bay, Sea of Japan)

A. A. Ryumina^a, P. Ya. Tishenko^a, E. M. Shkirnikova^a, Yu. A. Barabanshchikov^a

^a*Il'ichev Pacific Oceanological Institute, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia*

Concentrations of heavy metals in live and dead leaves, stems, rhizomes and roots of the seagrass *Zostera marina* Linnaeus, 1753 were analyzed in the study. On the basis of concentration, the metals were arranged in the following row: Fe > Mn > Zn > Cu > Pb > Ni > Cd. Differences in Fe, Pb, Ni, and Cd for live and dead leaves were revealed. The factor of sediment enrichment in heavy metals from dead leaves was calculated. The enrichment factor for the metals under study changed in the row Cu > Pb > Zn > Ni > Mn, and the value of solubility product [–lg(SP)] for sulfides of the above-listed metals changed in the same row.

Keywords: *Zostera marina*, heavy metals, Voevoda Bay, Amur Bay

УДК 591.5

РЕЗУЛЬТАТЫ ТРАНСЕКТНЫХ НАБЛЮДЕНИЙ ЗА МОРСКИМИ МЛЕКОПИТАЮЩИМИ В ТАТАРСКОМ ПРОЛИВЕ И НА ПЕРЕХОДАХ В СОПРЕДЕЛЬНЫХ АКВАТОРИЯХ ОСЕНЬЮ 2018 г.

© 2024 г. П. А. Пермяков¹, * (ORCID: 0000-0002-3213-2468),
С. Д. Рязанов¹ (ORCID: 0000-0001-6586-5759)

¹Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева (ТОИ) ДВО РАН,

Владивосток 690041, Россия

*e-mail: permyakovpa@poi.dvo.ru

Поступила в редакцию 31.08.2023 г.

После доработки 25.12.2023 г.

Принята к публикации 24.01.2024 г.

В октябре 2018 г. на трансектах в южной части Татарского пролива, а также на переходах в Японском море, через Татарский пролив и прол. Лаперуза был проведен судовой учет морских млекопитающих. Ранее подобные исследования в осенний период в этих районах не выполняли. Всего было встречено пять видов китообразных (в том числе белокрылая морская свинья, обыкновенная морская свинья, дельфин белобочка, косатка, малый полосатик) и два вида ластоногих (сивуч и северный морской котик). Исследование показало слабую заселенность района морскими млекопитающими в осеннее время.

Ключевые слова: морские млекопитающие, осеннее распределение, Татарский пролив, прол. Лаперуза

DOI: 10.31857/S0134347524030064

В общих чертах состав териофауны Татарского пролива и сопредельных вод известен (Аристов, Барышников, 2001; Беликов и др., 2017), однако сезонное распределение морских млекопитающих в этом районе остается слабо изученным. Это связано с тем, что изначально исследования млекопитающих в водах советского Дальнего Востока носили прикладной характер в интересах зверобойного и китобойного промыслов и часто были приурочены к периодам щенки или линьки животных (Друккер, Гакичко, 1935; Фрейман, 1935; Никулин, 1937; Шунтов, 1993). Большую часть прошлого века исследования млекопитающих Татарского пролива проводили как сопутствующие судовые наблюдения (Федосеев и др., 1970; Берзин, Владимиров, 1988; Блохин, 1988; Шунтов, 1993) или с помощью аэровизуального учета (Федосеев и др., 1970; Берзин и др., 1984; Лагерев, 1988). Район был довольно быстро признан перспективным для регулярной добычи (Косыгин,

Гольцев, 1971; Соболевский, 1984). Поэтому в советское время исследованию морских млекопитающих в осеннее время уделялось мало внимания. В 90-е годы прошлого века ситуация не улучшилась, поскольку коммерческий промысел ластоногих практически прекратился (промысел китообразных был прекращен еще раньше в рамках решений Международной китобойной комиссии). В нашем столетии некоторые сведения о териофауне северо-востока Японского моря были получены с помощью судовых (Кузин, Никулин, 2007; Кузин, Мамин, 2016) и авиационных наблюдений (Черноок и др., 2010; Черноок и др., 2014; Solovyev et al., 2015), а также благодаря находкам павших животных на берегу (Мухаметова и др., 2023). Кроме того, по отдельным видам поступали данные, полученные с использованием спутниковой телеметрии (Соловьёва и др., 2016; Trukhin et al., 2021; Permyakov et al., 2023). За редким исключением, существующие сведения не охватывали

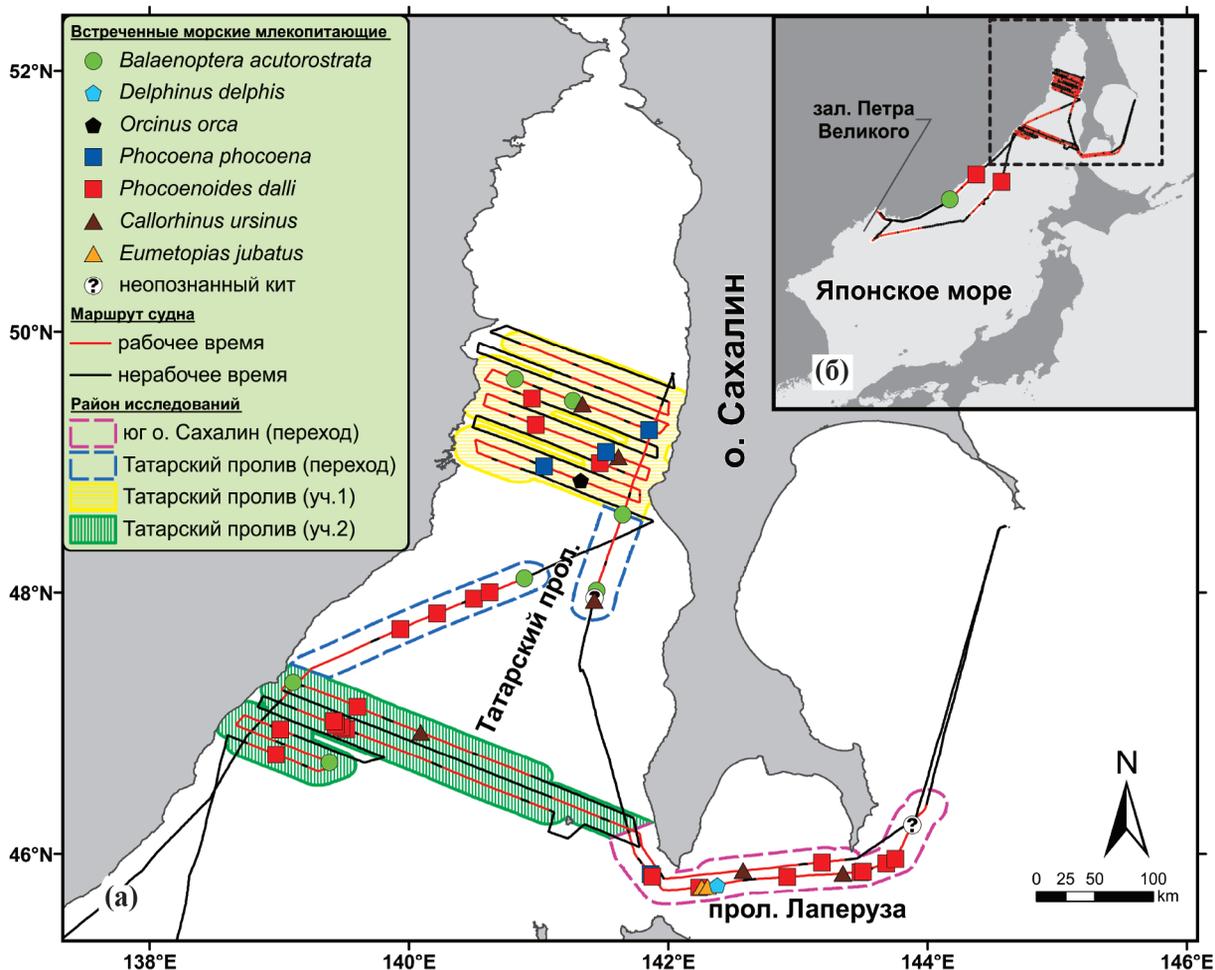


Рис. 1. Карта наблюдений за морскими млекопитающими во время 55-й комплексной экспедиции НИС “Академик Опарин”. (а) – в Татарском проливе и прол. Лаперуза; (б) – на переходах в Японском море.

осенне-зимнего периода и были ограничены отдельными видами или группами видов. Однако эффективное управление ресурсами морских млекопитающих невозможно без понимания распределения видов в течение всего года. С целью изучения видового состава и встречаемости морских млекопитающих в осенний период были проведены судовые наблюдения на трансектах в южной части Татарского пролива, а также на переходах в Японском море и прол. Лаперуза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Наблюдения выполнены на НИС “Академик Опарин” с 3 по 16 октября 2018 г. в ходе 55-й комплексной экспедиции (Валитов и др., 2020). Осмотр акватории вели с расположенной над рулевой рубкой наблюдательной площадки,

высота которой составляет 9.8 м (высота зрительной оси ~11.5 м) над уровнем моря. Удаление линии видимого горизонта при отсутствии тумана или осадков составляло 12.1 км. Осмотр акватории выполняли поочередно два наблюдателя в светлое время суток. Использовали 7×50 бинокль Pentax Marine, снабженный ретикулярной сеткой (дальномером и горизонтальной шкалой) для выполнения приближенных угловых измерений. Положение судна в момент времени фиксировали с помощью переносного GPS/ГЛОНАСС-навигатора Garmin eTrex 30×; направление на наблюдаемых животных указывали в румбах относительно курса судна. Большая часть наблюдений была выполнена на поперечно пересекающих Татарский пролив трансектах в центральной (участок 1) и южной (участок 2) частях акватории (рис. 1а). Площадь первого и второго трансектных

Таблица 1. Регистрации морских млекопитающих с борта НИС “Академик Опарин” осенью 2018 г.

Вид морского млекопитающего	Район исследований					Итоговая
	Японское море (переход)	юг о-ва Сахалин (переход)	Татарский прол. (переход)	Татарский прол. (участок 1)	Татарский прол. (участок 2)	
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	1 (1)	0 (0)	3 (3)	2 (2)	3 (2)	9 (8)
<i>Orcinus orca</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1)	0 (0)	2 (1)
<i>Delphinus delphis</i>	0 (0)	9 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	9 (1)
<i>Phocoena phocoena</i>	0 (0)	2 (1)	0 (0)	9 (3)	0 (0)	11 (4)
<i>Phocoenoides dalli</i>	8 (2)	35 (9)	29 (4)	8 (3)	19 (7)	99 (25)
<i>Callorhinus ursinus</i>	0 (0)	3 (2)	1 (1)	2 (2)	1 (1)	7 (6)
<i>Eumetopias jubatus</i>	0 (0)	5 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (2)
Неопознанный кит	0 (0)	3 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	4 (2)

Примечание. В скобках указано общее количество встреченных групп морских млекопитающих соответствующего вида.

участков, с учетом состояния видимости, составила 30 917 км² (48.5 часов рабочих усилий) и 27 578 км² (35.8 часов), соответственно. На трансектных участках оценка встречаемости морских млекопитающих, рассчитана как количество особей, приходящихся на 1000 км². На переходах в Японском море было осмотрено 40 460 км² (45.3 часов) (рис. 1б), в Татарском проливе – 13 424 км² (16.6 часов), а к югу от о. Сахалин – 15 281 км² (18.5 часов) (рис. 1а). Таким образом, общая площадь осмотренной акватории, включая переходы, составила 127 660 км², общая продолжительность рабочих усилий – 164.7 часов. Географические координаты групп морских млекопитающих определяли во время камеральной обработки относительно трека, записанного судовой навигационной системой. В лог трека, помимо координат и времени, входили скорость и курс судна. Обработка данных выполнена с использованием приложений ArcMap и MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Группы морских млекопитающих были встречены 49 раз (табл. 1). Наиболее часто встречаемым видом была белокрылая морская свинья *Phocoenoides dalli* (True, 1885) (99 особей). Чаше всего этих животных отмечали в южной части

Татарского пролива (0.26 особей/1000 км² на участке 1 и 0.69 особей/1000 км² на участке 2) и в водах южного Сахалина (рис. 1а). Прочие виды наблюдали заметно реже. Обыкновенную морскую свинью *Phocoena phocoena* (Linnaeus, 1758) (11 особей) регистрировали в центральной части Татарского пролива (0.29 особей/1000 км² на участке 1) и значительно меньше к югу от о-ва Сахалин. Мухаметова с соавторами (2023) отмечали, что в выбросах *P. dalli* представлены чаще, чем *P. phocoena*, однако соотношение было не столь выраженным, как в данном исследовании. Определенную роль могло сыграть несовпадение районов исследований: большинство *P. dalli* было зарегистрировано нами в западной части пролива, тогда как Мухаметова с соавторами (2023) анализировали выбросы на побережье о-ва Сахалин. Следует отметить, что *P. phocoena* при перемещении в море значительно менее заметны, чем *P. dalli*, из-за чего вероятность их обнаружения ниже, особенно с увеличением волнения моря. Группа в составе 9 дельфинов белобочек (*Delphinus delphis* Linnaeus, 1758) была встречена в прол. Лаперуза. Косатки (*Orcinus orca* (Linnaeus, 1758)) обнаружены лишь единожды в Татарском проливе (0.06 особей/1000 км² на участке 1). Установить принадлежность косаток к определенному экотипу не удалось.

Усатые киты были представлены только малым полосатиком *Balaenoptera acutorostrata* Lacépède, 1804 (9 особей) в Татарском проливе (0.06 особей/1000 км² на участке 1 и 0.11 особей/1000 км² на участке 2) и вдоль побережья Японского моря (рис. 1б). Ранее было отмечено, что у азиатского побережья малые полосатики весной мигрируют в северные районы (в том числе в Татарский пролив) для нагула, а осенью возвращаются на юг (Томилин, 1962). Сравнительно высокое число наблюдений в нашем исследовании говорит о том, что малые полосатики держатся в этом районе как минимум до середины октября.

Из ластоногих были встречены сивуч *Eumetopias jubatus* (Schreber, 1776) (5 особей) и северный морской котик *Callorhinus ursinus* (Linnaeus, 1758) (7 особей) (табл. 1). Оба вида обнаружены восточнее прол. Лаперуза. Кроме того, морских котиков несколько раз наблюдали в Татарском проливе (0.06 особей/1000 км² на участке 1 и 0.04 особей/1000 км² на участке 2). Регистрация сивуча в водах южного Сахалина не вызывает удивления, поскольку в прол. Лаперуза и вблизи от него действует несколько постоянных лежбищ этого вида (Burkanov, Loughlin, 2005). Обнаружение северных морских котиков в Татарском проливе хорошо согласуется с более ранними данными (Кузин, Маминов, 2016). Следует отметить, что в отличие от работы Кузина и Маминова (2016), проведенной в весенне-летний период (т.е. перед началом репродуктивного периода у северного морского котика), нами была охвачена осенняя часть годового цикла вида, завершающая период размножения. Об использовании акватории северо-востока Японского моря морскими котиками для осенне-летнего нагула было известно ранее (Кузин, 2014; Permyakov et al., 2023).

За время данного учета не было встречено ни одной ларги. При этом наши более ранние исследования показывают наличие ларги из зал. Петра Великого в октябре в Татарском проливе (Trukhin et al., 2021), в том числе и в районе, охваченном настоящими наблюдениями.

Выполненное исследование дополняет сведения о териофауне южной части Татарского пролива и демонстрирует, что в осеннее время этот район заселен морскими млекопитающими

слабо. В этот период преобладают морские свиньи обоих видов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны экипажу и участникам 55-й комплексной экспедиции НИС “Академик Опарин”, оказавшим помощь при выполнении работ, а также рецензентам, критические замечания которых позволили значительно улучшить статью.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа выполнена за счет средств бюджета Тихоокеанского океанологического института им. В.И. Ильичева ДВО РАН в рамках государственного задания № 121021500052-9.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данном исследовании экспериментов над животными не проводили, только визуальный осмотр с большого расстояния.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аристов А.А., Барышников Г.Ф. Хищные и ластоногие. СПб.: Наука, 2001.
- Беликов С.Е., Бурканов В.Н., Варенцов М.И. и др. Морские млекопитающие Российской Арктики и Дальнего Востока. Москва: ООО “Арктический Научный Центр”. 2017.
- Берзин А.А., Владимиров В.Л. Результаты наблюдений за распределением и численностью китообразных, полученные на китобойном судне “Добрый” в октябре—декабре 1987 г. // НИР по морским млекопитающим северной части Тихого океана в 1986—1987 гг., Москва: ВНИРО. 1988. С. 11—17.
- Берзин А.А., Владимиров В.А., Маминов М.К. Результаты авиаучета морских млекопитающих в Охотском море в 1981 и 1982 гг. // НИР по морским млекопитающим северной части Тихого океана в 1982/83, Москва: ВНИРО. 1984. С. 15—22.
- Блохин С.А. Результаты рейса НПС “Тунгус” по учету китообразных в прибрежных водах Дальневосточных морей в июне—октябре 1986 г. // НИР по морским млекопитающим северной части Тихого

- океана в 1986–1987 гг., Москва: ВНИРО. 1988. С. 24–37.
- Валитов М.Г., Ли Н.С., Сергеев А.Ф. и др. Комплексные экспедиционные исследования в Японском и Охотском морях в 55-м рейсе научно-исследовательского судна “Академик Опарин” // *Океанология*. 2020. Т. 60. Вып. 1. С. 1–4. doi: 10.31857/S0030157420010244
- Друккер Г.Ф., Гакичко С.И. Тихоокеанская белуха как промышленное сырье // *Тр. ВНИРО. Морские млекопитающие Дальнего Востока (сырьевая база и промышленное использование, Москва: “Всесоюзное кооперативное объединенное изд-во”*, 1935. Т. 3. С. 53–129.
- Косыгин Г.М., Гольцев В.Н. Материалы по морфологии и экологии ларги Татарского пролива. Исследования морских млекопитающих // *Тр. Атлантики, Калининград: Калининградская правда*. 1971. Т. 39. С. 238–252.
- Кузин А.Е. Северный морской котик: монография. Владивосток: ТИНРО-Центр. 2014.
- Кузин А.Е., Маминов М.К. О встречаемости северных морских котиков в Татарском проливе (Японское море) // *Изв. ТИНРО*. 2016. Т. 186. Вып. 3. С. 118–120. doi: 10.26428/1606-9919-2016-186-118-120
- Кузин А.Е., Никулин В.С. Сведения о встречаемости обыкновенной морской свиньи *Phocoena phocoena* в северо-западной части Тихого океана // *Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и северо-западной части Тихого океана: Сборник науч. тр.* 2007. Т. 9. С. 272–279.
- Лагерев С.А. Результаты авиационного обследования береговых лежбищ тюленей Охотского моря в 1986 г. // *НИР по морским млекопитающим северной части Тихого океана в 1986–1987 гг.*, 1988. С. 80–89.
- Мухаметова О.Н., Мухаметов И.Н., Власов А.О., Новокрещенных С.В. Анализ выбросов морских свиней (сем. *Phocoenidae*) на побережье о-ва Сахалин // *Морские млекопитающие Голарктики. Сборник научных трудов, Москва: “Совет по морским млекопитающим”*. 2023. С. 229–239. doi: 10.35267/978-5-9904294-8-2-2023-229-239
- Никулин П.Г. Наблюдения над ластоногими Охотского и Японского морей (сезон 1932–1935 гг.) // *Изв. ТИНРО*. 1937. Т. 10. С. 49–58.
- Соболевский Е.И. Распределение морских млекопитающих, их численность и роль как потребителей других животных в Японском море // *Морские млекопитающие Дальнего Востока. Владивосток: ТИНРО*. 1984. 39–53.
- Соловьев Б.А., Шнак О.В., Глазов Д.М. и др. Летнее распределение белух *Delphinapterus leucas* в Охотском море // *Русск. териологический журн.* 2015. Т. 14. С. 201–215.
- Соловьёва М.А., Глазов Д.М., Кузнецова Д.М., Рожнов В.В. Перемещения ларг (*Phoca largha*) в Охотском море по данным спутникового мечения // *Экология*. 2016. Т. 4. С. 313–320.
- Томилини А.Г. Китообразные фауны морей СССР. Москва: Изд-во АН СССР. 1962.
- Федосеев Г.А., Гольцев В.Н., Косыгин Г.М. Аэровизуальный учет тюленей на шенных залежках в Охотском море // *Изв. ТИНРО*. 1970. Т. 70. С. 107–113.
- Фрейман С.Ю. Материалы по промысловой биологии тюленей Дальнего Востока // *Тр. ВНИРО. Морские млекопитающие Дальнего Востока (сырьевая база и промышленное использование), Москва: “Всесоюзное кооперативное объединенное изд-во”*. 1935. Т. 3. С. 188–203.
- Черноок В.И., Болтнев А.И., Васильев А.Н. и др. Результаты авиасъемки тюленей в прибрежной зоне острова Сахалин летом 2009 г // *Материалы конференции Морские млекопитающие Голарктики VI. Калининград, Россия, 11–15 октября*. 2010. С. 620–626.
- Черноок В.И., Грачев А.И., Васильев А.Н. и др. Результаты инструментального авиаучета ледовых форм тюленей на льдах Охотского моря в мае 2013 г. // *Изв. ТИНРО*. 2014. Т. 179. Вып. 4. С. 158–176. doi: 10.26428/1606-9919-2014-179-158-176
- Шунтов В.П. Современное распространение китов и дельфинов в дальневосточных морях и сопредельных водах Тихого океана // *Зоол. журн.* 1993. Т. 72. Вып. 7. С. 131–141.
- Burkanov V.N., Loughlin T.R. Distribution and abundance of Steller sea lions, *Eumetopias jubatus*, on the Asian Coast, 1720’s–2005 // *Mar. Fish. Rev.* 2005. V. 67. № 2. P. 1–62.
- Permyakov P.A., Ryazanov S.D., Trukhin A.M. et al. First satellite tagging of the northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) on the Tyuleny Island, the Sea of Okhotsk // *Zool. Stud.* 2023. V. 62. Art. ID 3. doi:10.6620/ZS.2023.62-03
- Trukhin A.M., Permyakov P.A., Ryazanov S.D. et al. Migrations of young spotted seals (*Phoca largha*) from Peter the Great Bay, Sea of Japan/East Sea, and the pattern of their use of seasonal habitats // *PLoS One*. 2021. V. 16. № 1. Art. ID e0244232. doi:10.1371/journal.pone.0244232

Results of Transect Observations of Marine Mammals in the Tatar Strait and During Passages within Adjacent Water Areas in the Fall of 2018

P. A. Permyakov^a, S. D. Ryazanov^a

*^aIl'ichev Pacific Oceanological Institute, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences,
Vladivostok 690041, Russia*

A vessel-based survey of marine mammals was carried out at transects in the southern part of the Tatar Strait and during passages within the Sea of Japan and the La Perouse Strait in October 2018. Such surveys had not been previously conducted in these areas during the fall. A total of five species of cetaceans (including the Dall's porpoise, harbour porpoise, common dolphin, killer whale, and minke whale) and two species of pinnipeds (the Steller sea lion and northern fur seal) were sighted. The study showed a low occurrence of marine mammals in the area during the fall season.

Keywords: marine mammals, fall distribution, Tatar Strait, La Perouse Strait

УДК 639:597.541

НАРУШЕНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ ПЕЧЕНИ ОБЫКНОВЕННОЙ КИЛЬКИ *CLUPEONELLA CASPIA* SVETOVIDOV, 1941 В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ

© 2024 г. Т. Х. В. Нгуен^{1, *} (ORCID: 0000-0002-6910-2705),
М. П. Грушко^{1, 2} (ORCID: 0000-0001-7529-5382),
Н. Н. Федорова¹ (ORCID: 0000-0001-9411-6642),
В. А. Чаплыгин¹ (ORCID: 0000-0002-0509-702X)

¹Астраханский государственный технический университет, Астрахань 414056, Россия

²Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ), Москва 125080, Россия

*e-mail: hongvannguyen@mail.ru

Поступила в редакцию 06.09.2023 г.

После доработки 25.01.2024 г.

Принята к публикации 02.02.2024 г.

Гистопатологические изменения широко используются в качестве биомаркёров состояния здоровья рыб, подвергшихся воздействию химических соединений. У особой обыкновенной кильки *Clupeonella caspia* Svetovidov, 1941, выловленных в Среднем Каспии, были обнаружены значительные изменения клеточной структуры печени. Чаще всего наблюдались признаки гиперемии: отек паренхимы и полнокровие сосудов, а также лимфо-макрофагальная инфильтрация, мелкие кровоизлияния и сужение просвета желчного протока.

Ключевые слова: *Clupeonella caspia*, печень, гистология, гистопатология

DOI: 10.31857/S0134347524030072

Рыбы, как и другие водные организмы, часто подвергаются негативному воздействию загрязнителей окружающей среды, таких как стоки промышленных предприятий и сельскохозяйственных объектов. Наиболее опасными для гидробионтов являются вещества, которые устойчивы к быстрому разложению в природной среде, проявляют значительную биологическую эффективность и обладают высоким потенциалом накопления (Bernet et al., 1999; Au, 2004; López-López, Sedeño-Díaz, 2015). У рыб поллютанты могут вызывать множество проблем со здоровьем, в том числе структурные изменения и заболевания на уровне популяции (Schmalz et al., 2002; Lukin et al., 2011). Ранние токсические эффекты загрязнения могут проявляться на клеточном или тканевом уровне, прежде чем можно будет выявить значительные изменения в поведении или внешнем виде рыб.

Гистологические показатели являются очень чувствительным параметром и имеют решающее

значение для определения клеточных изменений в органах-мишенях, таких как печень. Гистопатологические изменения широко используются для биомониторинга как биомаркёров состояния здоровья рыб, подвергшихся воздействию химических соединений в лабораторных экспериментах (Thophon et al., 2003; Boran et al., 2012), или в полевых исследованиях (Неваленный и др., 2022б; Stendiford et al., 2003). Гистопатологические изменения в тканях животных также являются первичными биоиндикаторами воздействия факторов, вызывающих экологический стресс (Teh et al., 1997).

Печень играет важную роль в поглощении, биотрансформации и детоксикации загрязняющих веществ (Gernhöfer et al., 2001), а исследования эндемичных видов рыб показали, что гистопатологии печени являются полезными эталонными биомаркёрами воздействия загрязняющих веществ (An atlas ..., 1982; Stendiford et al., 2003; Van Dyk et al., 2012; Oliva et al., 2013).

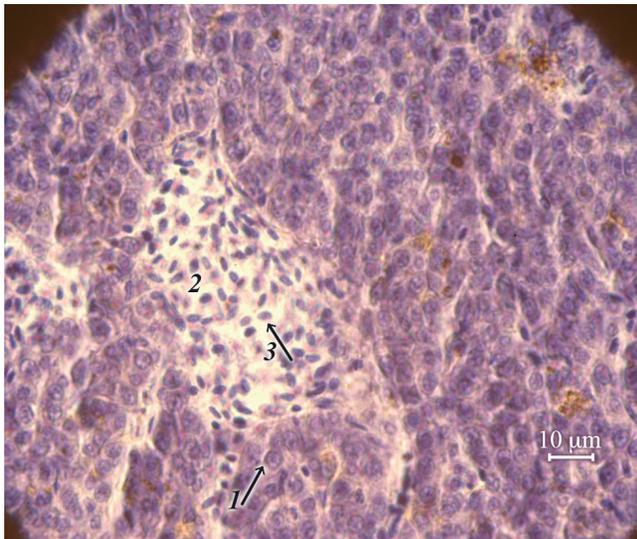


Рис. 1. Сохранившаяся структура печени обыкновенной кильки *Clupeonella caspia*. Ув. $\times 1000$. 1 – гепатоцит с крупным ядром, 2 – центральная вена, 3 – эритроциты.

Таким образом, гистология печени рыб может служить моделью для изучения взаимодействий между факторами окружающей среды и структурой и функцией печени (Терпугова и др., 2022; Hinton, Laurén, 1993; Gernhöfer et al., 2001).

Цель данной работы – изучение гистологических изменений в печени обыкновенной кильки *Clupeonella caspia* в условиях деградации водной среды под воздействием антропогенной деятельности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектом исследования служили взрослые особи обыкновенной кильки *Clupeonella caspia* Svetovidov, 1941, выловленные в центральной части Среднего Каспия в сентябре 2022 г. Для оценки состояния внутренних органов и тканей отобрали 30 особей. Промысловая длина рыб (l) (от вершины рыла до основания средних лучей хвостового плавника) в среднем составляла 10.02 ± 0.39 см. Средняя абсолютная длина (L) (от кончика головы до конца длинной лопасти хвостового плавника) – 11.5 ± 0.32 см (Правдин, 1966). Для фиксации проб органов использовали 10% раствор нейтрального формалина, далее материал заливали в парафин, делали срезы толщиной 5 микрометров и окрашивали гематоксилин-эозином. Квасцовым гематоксилином Эрлиха окрашивали ядра,

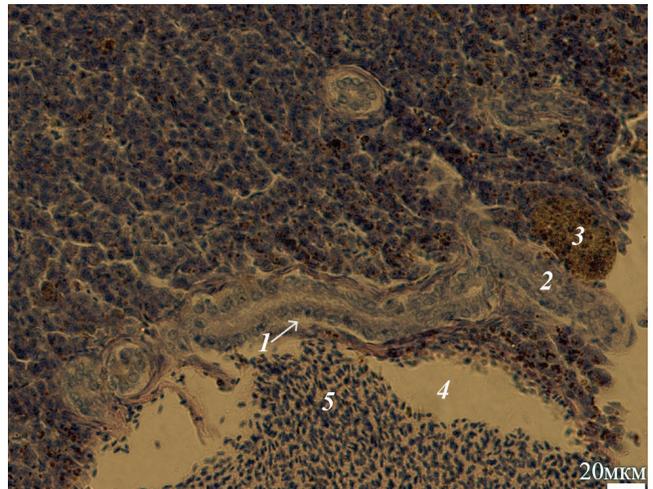


Рис. 2. Суженный просвет желчного протока в печени обыкновенной кильки *Clupeonella caspia*. Ув. $\times 400$. 1 – отрыв базальной мембраны от кубических эпителиоцитов, 2 – сужение просвета желчного протока, 3 – крупная гранула гемосидерина, 4 – междольковая вена, 5 – форменные элементы крови.

эозином – цитоплазму клеток. Депарафиновые срезы окрашивали раствором гематоксилина в течение 10–15 мин, затем их переносили в дистиллированную воду и промывали в воде с небольшим количеством щелочи. Окрашенные гематоксилином срезы переносили в раствор эозина на 0.5–2 минуты, затем промывали в дистиллированной воде, и, обезвожив в спиртах, заключали через ксилол в канадский бальзам (Волкова, Елецкий, 1989; Мельникова, 2015). Микроскопию и микросъемку срезов органов осуществляли с помощью светового микроскопа Olympus VX-43.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Балочная структура печени обыкновенной кильки в целом была без изменений. Были выделены основные элементы ее строения: гепатоциты, синусоидные капилляры, вены, желчные протоки (рис. 1, 2). Несмотря на присутствие этих структур, типичная триада печени, характерная для млекопитающих, у рыб отсутствует (Гентен и др., 2016). Трабекулярная архитектоника не была выражена. Между гепатоцитами встречались макрофаги. Гепатоциты представляли собой крупные клетки диаметром 3.72 ± 0.09 мкм с хорошо выраженным круглым ядром. В ядре имелись 1–3 ядрышка. Тем не менее у большинства исследуемых

особей наблюдались патологические изменения гистологической структуры печени.

У основной массы изученных рыб было отмечено полнокровие сосудов, просветы которых были заполнены форменными клетками крови. В строме печени большинства рыб наблюдалась лимфо-макрофагальная инфильтрация, что свидетельствовало о наличии воспалительных процессов в органе. Просветы желчного протока были сужены. Однослойный кубический эпителий, который выстилал желчные протоки, имел разрыв базальных мембран в некоторых местах (рис. 2). На срезе были отмечены гемосидеринные зерна различной величины, так называемые меланомакрофаговые центры печени (ММЦ). Диаметр таких зерен варьировал от 1 до 7.53 мкм. Около кровеносных сосудов встречались гигантские гемосидеринные гранулы округлой формы (рис. 2). Лейкоцитарная реакция вокруг ММЦ отсутствовала, и они непосредственно контактировали с паренхимой печени или со структурами адвентициальной оболочки кровеносного сосуда.

Кроме того, на срезе были отмечены мелкие кровоизлияния, что свидетельствовало о микроциркулярном расстройстве. У отдельных особей паренхима печени была отечна, не определялись границы клеток печени или их ядер. Серозная оболочка печени была разрушена. Балочная структура также не сохранена. На срезах печени других особей кильки регистрировали участки гепатоцеллюлярной аденомы, представляющие собой доброкачественные опухолевые образования, четко отделенные от окружающей паренхимы соединительной тканью (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Скопления пигментированных клеток, называемые меланомакрофаговыми центрами, присутствуют в селезенке, печени и почках как часть защитной системы рыб, амфибий и рептилий, и используются в качестве объектов микропатоморфологических и токсикологических исследований (Mackmull, Michels, 1932; Roberts, 1975; Wolke et al., 1985; Scalia et al., 1988; Pintucci et al., 1990; Wolke, 1992; Khan et al., 1994; Couillard, Hodson, 1996; Naaparanta et al., 1996; Zuasti et al., 1998). Основными функциями ММЦ

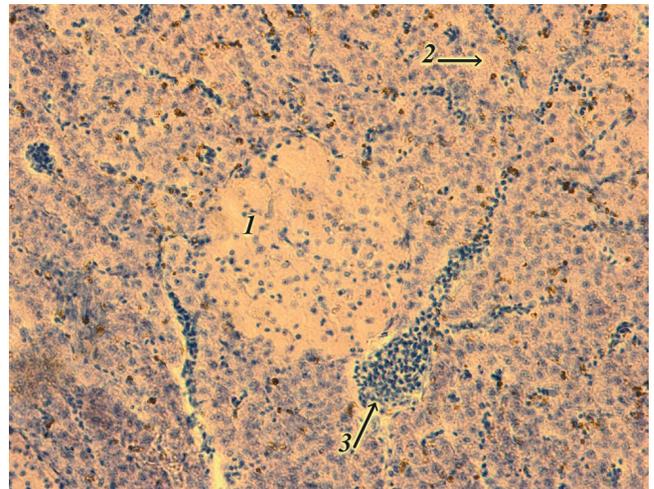


Рис. 3. Гепатоцеллюлярная аденома на фоне лейкоцитарной инфильтрации в печени обыкновенной кильки *Clupeonella caspia*. Ув. $\times 400$. 1 – отдельный участок опухоли, 2 – отек паренхимы печени, 3 – вена.

являются хранение, разрушение и детоксикация эндогенного и экзогенного материалов, включая паразитов (Roberts, 1975; Wolke, 1992; Agius, Roberts, 2003). В зависимости от разнообразия пигментов и клеточного состава меланомакрофаги на срезах различаются по форме и окрашиваются гематоксилин-эозином от желтого до золотисто-коричневого и черного. Было доказано, что пролиферация ММЦ зависит от нескольких факторов, таких как возраст, репродуктивная стадия, инфекционные заболевания и токсические загрязнения (Agius, Roberts, 2003; Rabitto et al., 2005). Следовательно, интенсивность проявления ММЦ была предложена в качестве потенциально полезного биомаркера загрязнения и деградации окружающей среды (Murchelano, Wolke, 1991; Manera et al., 2000). Результаты исследований ряда ученых показали, что наличие гемосидерина в ММЦ нередко связано с воспалительным процессом, вызванным микроорганизмами или токсикологическим стрессом (Gomes et al., 2015; Oliveira et al., 2015). Увеличение количества ММЦ может быть объяснено воздействием загрязняющих веществ на организм рыб, питанием, наличием болезней и условиями окружающей среды (Черепанова и др., 2019; Manrique et al., 2014; Rabitto et al., 2005; Ribeiro et al., 2011). Более того, увеличение количества меланомакрофагов было отмечено у рыб, подверженных воздействию токсических веществ, и указывает на повышенную концентрацию тяжелых металлов в окружающей

среде (Poleksic et al., 2010). Как было установлено, обыкновенная килька способна аккумулировать тяжелые металлы, такие как медь, цинк и ртуть (Зайцев, 2020; Неваленный и др., 2022а).

Полнокровие — это увеличение притока крови к тканям печени, что является свидетельством детоксикации и, следовательно, рассматривается как показатель стресса, возникающего у рыб в присутствии ксенобиотиков (Rezende et al., 2014). Была выявлена корреляция между загрязнением металлами и патологическими изменениям печени моссульской уклейки *Alburnus mossulensis* (Dane, Şişman, 2020).

Многие авторы объясняли изменения в печени рыб воздействием токсичных веществ, например, цинка (Abdel-Warith et al., 2011), алюминия (Hadi, Alwan, 2012), сульфата кадмия (Jalaludeen et al., 2012) и трихлорофона (Xu et al., 2012). Наличие лейкоцитарной инфильтрации часто связано с воспалительным процессом, протекающим в организме рыб (Wolf, Wheeler, 2018). Гистологическое исследование печени особей подуста обыкновенного *Chondrostoma nasus*, выловленного в верхнем участке р. Муреш (Румыния), выявило подобные изменения ткани органа (очаговое воспаление с лимфоцитарной инфильтрацией, накопление макрофагов и некроз одиночных гепатоцитов). Именно у этих рыб было исключительно высокое накопление кадмия и меди в печени, что является подтверждением и наших результатов.

Таким образом, выявленные гистологические особенности печени обыкновенной кильки в исследованных местообитаниях свидетельствовали о наличии стрессирующего воздействия, возможно, связанного с измененными гидрохимическими показателями воды Среднего Каспия или взаимодействием комплекса факторов. Для более точной оценки состояния окружающей среды и обитающих в ней организмов необходимо провести детальные исследования с применением различных методов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджетов Астраханского государственного технического университета и Российского биотехнологического университета (РОСБИОТЕХ). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с рекомендациями этической комиссии Научно-технического совета ФГБОУ ВО “Астраханский государственный технический университет”; с соблюдением принципа “3 R” (Replace, Reduce and Refine: замена, сокращение и усовершенствование — см. Zurlo et al, 1996), принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей (Страсбург, 1986 г.) и Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. М.: Медицина. 1989. С. 142–256.
- Гентен Ф., Тервинге Э., Данги А. Атлас гистологии рыб. СПб.: Проспект науки. 2016.
- Зайцев В.Ф. Биогеохимия Каспийского моря в условиях техногенеза биосферы // Биогеохимические инновации в условиях коррекции техногенеза биосферы: Тр. Международ. биогеохимического симпозиума (Тирасполь, 5–7 ноября 2020). 2020. Т. 1. С. 67–71.
- Мельникова М.С. Гистопатологические методы в оценке состояния здоровья рыб при искусственном выращивании // Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов: расширенные материалы IV Международ. конф. (Борок, 24–27 сентября 2015). Ярославль: Филигрань. 2015. С. 331–337.
- Неваленный А.Н., Ершова Т.С., Зайцев В.Ф., Чаплыгин В.А. Биогеохимический мониторинг содержания химических элементов Каспийского моря // Вестн. АГТУ. Сер.: Рыб. хоз-во. 2022а. № 4. С. 22–28.
- Неваленный А., Чаплыгин В., Федорова Н. Особенности изменений внутренних органов кефали-сингиля *Liza aurata* (Risso, 1910) // Вестн. АГТУ. Сер.: Рыб. хоз-во. 2022б. № 3. С. 60–65.
- Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб (преимущественно пресноводных). Москва: Пищ. пром-сть. 1966.
- Терпугова Н.Ю., Ван Н.Т.Х., Грушко М.П., Федорова Н.Н. Патоморфология печени и жабр у рыб

- дельты Волги // Вестн. Керченского гос. морского технол. ун-та. 2022. № 3. С. 39–49.
- Черепанова А.А., Дробот Г.П., Осипов В.В. и др. Гистохимическое исследование печени двух видов карасей из водоемов заповедника “Приволжская лесостепь” // Современные проблемы медицины и естественных наук. 2019. Вып. 8. С. 174–175.
- Abdel-Warith A.A., Younis E.M., Al-Asgah N.A., Wahbi O.M. Effect of zinc toxicity on liver histology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* // Sci. Res. Essays. 2011. V. 6. № 17. P. 3760–3769.
- Agius C., Roberts R.J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology // J. Fish Dis. 2003. V. 26. № 9. P. 499–509. doi:10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x
- An atlas of fish histology: Normal and pathological feature / ed. T. Hibiya. Tokyo: Kodansha. 1982.
- Au D.W.T. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review // Mar. Pollut. Bull. 2004. V. 48. № 9–10. P. 817–834.
- Bernet D., Schmidt H., Meier W. et al. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution // J. Fish Dis. 1999. V. 22. № 1. P. 25–34.
- Boran H., Capkin E., Altinok I., Terzi E. Assessment of acute toxicity and histopathology of the fungicide captan in rainbow trout // Exp. Toxicol. Pathol. 2012. V. 64. № 3. P. 175–179.
- Couillard C.M., Hodson P.V. Pigmented macrophage aggregates: a toxic response in fish exposed to bleached-kraft mill effluent? // Environ. Toxicol. Chem. 1996. V. 15. P. 1844–1854.
- Dane H., Şişman T. Effects of heavy metal pollution on hepatosomatic index and vital organ histology in *Alburnus mossulensis* from Karasu River // Turk. J. Vet. Anim. Sci. 2020. V. 44. P. 607–617. 10.3906/vet-1904-50
- Gernhöfer M., Pawet M., Schramm M. et al. Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams // J. Aquat. Ecosyst. Stress Recovery. 2001. V. 8. № 3–4. P. 241–260.
- Gomes I.B.S., Porto M.L., Santos M.C.L. et al. The protective effects of oral low-dose quercetin on diabetic nephropathy in hypercholesterolemic mice // Front. Physiol. 2015. V. 6. Art. ID 247.
- Haaparanta A., Valtonen E.T., Hoffmann R., Holmes J. Do macrophage centres in fresh water fishes reflect the differences in water quality? // Aquat. Toxic. 1996. V. 34. P. 253–272.
- Hadi A.A., Alwan S.F. Histopathological changes in gills, liver and kidney of fresh water fish, *Tilapia zillii*, exposed to aluminum // Int. J. Pharm. Life Sci. 2012. V. 3. № 11. P. 2071–2081.
- Hinton D.E., Laurén D.J. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure // Biomarkers of environmental contamination. Boca Raton: Lewis Publ. 1993. P. 51–65.
- Jalaludeen M.D., Arunachalam M., Raja M. et al. Histopathology of the gill, liver and kidney tissues of the freshwater fish *Tilapia mossambica* exposed to cadmium sulphate // Int. J. Adv. Biol. Res. 2012. V. 2. № 4. P. 572–578.
- Khan R.A., Barker D.E., Hooper R. et al. Histopathology in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) living adjacent to a pulp and paper mill // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1994. V. 26. P. 95–102.
- López-López E., Sedeño-Díaz J.E. Biological indicators of water quality: The role of fish and macroinvertebrates as indicators of water quality // Environmental Indicators, Dordrecht: Springer. 2015. P. 643–661. doi: 10.1007/978-94-017-9499-2_37
- Lukin A., Sharova J., Belicheva L., Camus L. Assessment of fish health status in the Pechora River: effects of contamination // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2011. V. 74. № 3. P. 355–365.
- Mackmull G., Michels N.A. Absorption of colloidal carbon from the peritoneal cavity in the teleost *Tautoglabrus adspersus* // Am. J. Anat. 1932. V. 51. P. 3–47.
- Manera M., Serra R., Isani G., Carpené E. Macrophage aggregates in gilthead sea bream fed copper, iron and zinc enriched diets // J. Fish Biol. 2000. V. 57. P. 457–465. doi:10.1111/j.1095-8649.2000.tb02184.x
- Manrique W.G., Claudiano G.S., Petrillo T.R. et al. Response of splenic melanomacrophage centers of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) to inflammatory stimuli by BCG and foreign bodies // J. Appl. Ichthyol. 2014. V. 30. № 5. P. 1001–1006.
- Murchelano R.A., Wolke R.E. Neoplasms and nonneoplastic liver lesions in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, from Boston Harbor, Massachusetts // Environ. Health Perspect. 1991. V. 90. P. 17–26.
- Oliva M., Vicente-Martorell J.J., Galindo-Riano M.D., Perales J.A. Histopathological alterations in Senegal sole, *Solea senegalensis*, from a polluted Huelva estuary (SW, Spain) // Fish Physiol. Biochem. 2013. V. 39. № 3. P. 523–545.
- Oliveira L.A., Almeida J., Benini R., Crestani C.C. CRF₁ and CRF₂ receptors in the bed nucleus of the stria terminalis modulate the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats // Pharmacol. Res. 2015. V. 95–96. P. 53–62. doi: 10.1016/j.phrs.2015.03.012
- Pintucci G., Manzionna M., Maida I. et al. Morpho-functional characterization of cultured pigment cells

- from *Rana esculenta* L. liver // In Vitro Cell Dev. Biol. 1990. V. 26. P. 659–664.
- Poleksic V., Lenhardt M., Jaric I. et al.* Liver, gills, and skin histopathology and heavy metal content of the Danube sterlet (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758) // Environ. Toxicol. Chem. 2010. V. 29. № 3. P. 515–521. doi:10.1002/etc.82
- Rabitto I.S., Costa J.R.M.A., Assis H.C.S. et al.* Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2005. V. 60. № 2. P. 147–156.
- Rezende K.F.O., Santos R.M., Borges J.C.S. et al.* Histopathological and genotoxic effects of pollution on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) in the Billings Reservoir (Brazil) // Toxicol. Mech. Methods. 2014. V. 24. № 6. P. 404–411. doi:10.3109/15376516.2014.925020
- Ribeiro H.J., Procópio M.S., Gomes J.M.M. et al.* Functional dissimilarity of melanomacrophage centres in the liver and spleen from females of the teleost fish *Prochilodus argenteus* // Cell Tissue Res. 2011. V. 346. № 3. P. 417–425.
- Roberts R.J.* Melanin-containing cells of teleost fish and their relation to disease // The pathology of fishes. Madison, Wis.: Univ. Wisconsin Press. 1975. P. 399–428.
- Scalia M., Geremia E., Corsaro C. et al.* The extracutaneous pigmentary system: evidence for melanogenesis in Amphibia and Reptilia liver // Comp. Biochem. Physiol. Part B: Comp. Biochem. 1988. V. 89. P. 715–717.
- Schmalz W.F.Jr., Hernandez A.D., Weis P.* Hepatic histopathology in two populations of the mummichog, *Fundulus heteroclitus* // Mar. Environ. Res. 2002. V. 54. № 3–5. P. 539–542.
- Stentiford G.D., Longshaw M., Lyons B.P. et al.* Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants // Mar. Environ. Res. 2003. V. 55. № 2. P. 137–159.
- Teh S.J., Adams S.M., Hinton D.E.* Histopathological biomarkers in freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress // Aquat. Toxicol. 1997. V. 37. P. 51–70. doi:10.1016/S0166-445X(96)00808-9
- Thophon S., Kruatrachue M., Upathan E.S. et al.* Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure // Environ. Pollut. 2003. V. 121. № 3. P. 307–320.
- Van Dyk J.C., Cochrane M.J., Wagenaar G.M.* Liver histopathology of the sharpnose catfish *Clarias gariepinus* as a biomarker of aquatic pollution // Chemosphere. 2012. V. 87. № 4. P. 301–311.
- Wolf J.C., Wheeler J.R.* A critical review of histopathological findings associated with endocrine and non-endocrine hepatic toxicity in fish models // Aquat. Toxicol. 2018. V. 197. P. 60–78. doi:10.1016/j.aquatox.2018.01.013
- Wolke R.E.* Piscine macrophage aggregates: a review // Annu. Rev. Fish Dis. 1992. V. 2. P. 91–108.
- Wolke R.E., Murchelano R.A., Dickstein C., George C.J.* Preliminary evaluation of the use of macrophage aggregates (MA) as fish health monitors // Bull. Environ. Contamin. Toxicol. 1985. V. 35. P. 222–227.
- Xu W., Liu W., Lu K. et al.* Effect of trichlorfon on oxidative stress and hepatocyte apoptosis of *Carassius auratus gibelio* in vivo // Fish Physiol. Biochem. 2012. V. 38. P. 769–775. https://doi.org/10.1007/s10695-011-9559-z
- Zuasti A., Jiménez-Cervantes C., García-Borón J.C., Ferrer C.* The melanogenic system of *Xenopus laevis* // Arch. Histol. Cytol. 1998. V. 61. P. 305–316.
- Zurlo J., Rudacille D., Goldberg A.M.* The three Rs: the way forward // Environ. Health Perspect. 1996. V. 104. P. 878–880.

Structural Changes in Liver Histology in Common Kilka *Clupeonella caspia* Svetovidov, 1941 under Anthropogenic Pressure

T. H. V. Nguyen^a, M. P. Grushko^{a, b}, N. N. Fedorova^a, V. A. Chaplygin^a

^aAstrakhan State Technical University, Astrakhan 414056, Russia

^bRussian Biotechnological University, Moscow 125080, Russia

Histopathological changes are widely used as biomarkers of the health status of fish exposed to chemical compounds. Individuals of the common kilka *Clupeonella caspia* Svetovidov, 1941 caught from the Middle Caspian Sea exhibited significant changes in the cellular structure of the liver. The more common were signs of hyperemia: an edema of the liver parenchyma, vascular congestion, lymphomacrophage infiltration, small hemorrhages, and a narrowing of the bile duct lumen.

Keywords: *Clupeonella caspia*, liver, histology, histopathology

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ ЖУРНАЛА “БИОЛОГИЯ МОРЯ”

Журнал “Биология моря” печатает статьи по фундаментальным и прикладным проблемам морской биологии. В журнале публикуются обзоры, оригинальные исследования, краткие сообщения, а также хроника и материалы по истории морской биологии. Предпочтение отдается статьям, имеющим общебиологическое значение. По получении рукописи редакция в 14-дневный срок извещает автора по электронной почте о принятии работы к рассмотрению или отклонении. Все поступившие рукописи проходят проверку в системе “Антиплагиат”. К рассмотрению принимаются только статьи, уровень оригинальности которых выше 80%.

Рукописи, принятые к рассмотрению, проходят двойное независимое рецензирование. Решение о публикации или отклонении принимают члены редакционной коллегии. Редакция вправе не вступать в переписку с автором относительно причин отказа в публикации. Очередность публикации статей определяется их научной значимостью. Право на внеочередную публикацию распространяется на статьи аспирантов (на основании письма, заверенного ученым секретарем учреждения). ПДФ файлы высокого разрешения предоставляются авторам по запросу.

Редакция принимает рукописи на русском и английском языках (последнее – от иностранных авторов). Статьи, переведенные на английский язык, и оригинальные статьи иностранных авторов публикуются в англоязычной версии журнала (“Russian Journal of Marine Biology”) по отдельным правилам (см.: <http://pleiades.online/en/authors/guidlines/prepare-electronic-version/text/>).

Во избежание таксономической путаницы рукопись, содержащая описание новых для науки таксонов, публикуется один раз: либо в русскоязычной версии журнала (если статья написана на русском языке), либо в англоязычной

версии (если статья написана на английском языке). В первом случае диагноз таксона необходимо привести и на английском языке. Описание новых для науки таксонов должно быть оформлено в соответствии с правилами международных кодексов зоологической (МКЗН) или ботанической (МКБН) номенклатуры.

Текст рукописи следует набирать через 1.5 интервала, размер шрифта – 14. Объем обзора не должен превышать 30 страниц формата А4, статьи – 18, краткого сообщения – 9, прочих материалов (рецензия, хроника и т.д.) – 5 страниц, включая список литературы и таблицы. После переработки рукописи ее объем не должен превышать установленного. Строки и страницы необходимо пронумеровать. Статью на электронном носителе можно принести в редакцию или прислать электронной почтой (biolm@imb.dvo.ru), либо направить через Редакционно-Издательскую Систему издателя (<https://sciencejournals.ru/journal/biomor/>).

Вместе с рукописью авторы обязаны предоставить в редакцию в электронном виде “Договор о передаче авторского права” для компании “Pleiades Publishing” и “Лицензионный договор о предоставлении права использования статьи в научном журнале на русском языке, учредителем (соучредителем) которого является РАН”. Договоры должны подписать все авторы статьи. Тексты договоров можно взять в редакции, на сайте журнала www.bm.dvo.ru в разделе “Правила для авторов” или на сайте Pleiades Publishing <https://www.pleiades.online/ru/authors/guidlines/>. Договоры вступают в силу с момента утверждения статьи к печати.

Редколлегия журнала предлагает авторам назвать 3–5 возможных рецензентов своей рукописи (фамилия, имя, отчество, ученая степень, место работы, электронный адрес). Рецензенты не должны работать в одном учреждении с авторами рукописи.

Рукопись, направленная автору на доработку или переработку, должна быть возвращена в редакцию в исправленном виде в течение двух месяцев. По истечении этого срока она будет снята с учета как не возвращенная в срок. К доработанной (переработанной) рукописи необходимо приложить письмо автора с описанием исправлений и с подробными ответами на все замечания рецензентов. После утверждения статьи к печати автор не может вносить существенных изменений и добавлений.

Рукопись оригинальной статьи должна содержать следующие структурные элементы (для кратких сообщений разделение необязательно):

1. Название статьи, инициалы и фамилии авторов с указанием ORCID-кодов, название научного учреждения с указанием города и почтового индекса, адресов электронной почты с отметкой адреса для переписки. Принадлежность авторов к разным учреждениям следует обозначить цифрами. Над названием статьи слева – рубрикация статьи по УДК.

При написании латинского названия вида в названии статьи следует указать автора и год опубликования (в тексте статьи эти сведения можно привести только при первом упоминании таксона). Фамилию автора таксона необходимо писать полностью, без сокращений. Если перед латинским названием объекта исследования не указывается его принадлежность к таксону более высокого ранга (например, "... форонида *Phoronopsis harmeri*"), то после латинского названия вида или рода в скобках следует указать названия более высоких таксонов, к которым относится объект исследования и ранг которых определяет автор. Это могут быть либо тип и класс (например, Tardigrada: Heterotardigrada), либо класс и отряд (Polychaeta: Phyllodocida), либо отряд и семейство (Decapoda: Lithodidae).

2. Краткая аннотация (не более 1/2 страницы) и ключевые слова (4–7 слов или словосочетаний на основном языке статьи).

3. Введение (не более двух страниц) должно содержать историю вопроса (желательно ограничиться краткой характеристикой его современного состояния), цели, задачи исследования и его актуальность.

4. Материал и методика. Оригинальные или малоизвестные методы необходимо подробно описать. При использовании стандартных методик достаточно дать ссылки. В таксономических и флоро-фаунистических статьях необходимо указать место хранения изученного материала.

5. Результаты. Приводить результаты, полученные в процессе исследования.

6. Обсуждение результатов следует отделять от "результатов".

7. Благодарности. Приводятся сведения о лицах, способствовавших проведению работы. Данный раздел не включает информацию об источниках финансирования.

8. Конфликт интересов. Конфликт интересов – это любые отношения или сферы интересов, которые могли бы прямо или косвенно повлиять на вашу работу или сделать её предвзятой. В этом разделе авторы заявляют о наличии или отсутствии у них конфликта интересов в финансовой или в какой-либо иной сфере. Если конфликта интересов нет, следует указать: "Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов". Если конфликт интересов есть, следует указать, например: "Автор Х.Х.Х. владеет акциями Компании Y, которая упомянута в статье. Автор Y.Y.Y. – член комитета ХХХХ".

9. Соблюдение этических норм. Необходимо указать информацию о соблюдении стандартов работы с животными или людьми. Если в работе не использовались животные и люди в качестве объектов исследования, следует написать: "Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов".

10. Финансирование. Если работа выполнена при поддержке какой-либо организации, в разделе "Финансирование" следует указать, каким фондом и грантом поддержано данное исследование и каждая часть работы в отдельности, если источники финансирования разные.

11. Список литературы должен быть составлен в алфавитном порядке – сначала на кириллице, затем на латинице. Библиографическое описание работ, опубликованных на японском, китайском и других восточных языках, необходимо

приводить в английском переводе с указанием языка оригинала.

Работы одного автора располагаются в хронологическом порядке, при наличии пяти и более авторов приводятся фамилии первых трех с последующим указанием “и др.” или “et al.”. Для книг: после фамилии и инициалов автора необходимо указать название книги, место издания, издательство, год издания и количество страниц. Для статей: после фамилии и инициалов автора указать название статьи, через две косые линии — название журнала или сборника (место издания и издательство приводятся только при ссылке на составную часть книги), год издания, том, номер или выпуск, страницы. Рукописи со списком литературы, оформленным не по правилам журнала, к рассмотрению не принимаются.

Примеры:

Виноградов М.Е. Вертикальное распределение океанического зоопланктона. М.: Наука. 1968. 320 с.

Гуреева М.А., Иванов А.В. О формировании целомической мезодермы у эмбрионов *Oligobranchia mashikoi* (Pogonophora) // Зоол. журн. 1986. Т. 65. Вып. 6. С. 780–788.

Иванов А.В. Погонофоры // Фауна СССР. Нов. сер. М.; Л.: Изд-во АН СССР. 1960. № 75. 271 с.

Burdon-Jones C. Development and biology of the larva of *Saccoglossus horsti* // Phil. Trans. Roy. Soc. London. B. 1952. V. 236. P. 553–590.

12. Таблицы должны быть предоставлены в виде отдельных файлов.

13. Иллюстрации должны быть представлены в виде отдельных файлов в формате tiff или jpeg с минимальным разрешением 300 dpi для фотографий и 600 dpi для графических рисунков. Файлы с другими расширениями редакция не рассматривает. Все рисунки (включая фотографии) должны иметь высокое качество и не требовать дополнительного редактирования.

Иллюстрации следует обозначать как “рис.” и нумеровать в порядке их упоминания в тексте. Если рисунок (фотография) состоит из нескольких частей, их следует обозначить русскими буквами в скобках, например: (а), (б), (в) и т.д. Если необходимо, то на изображении ставят масштабную линейку. Ширина линии

масштабной линейки должна быть одинаковой на всех изображениях одного рисунка.

При использовании опубликованных ранее рисунков автору следует получить разрешение издателя.

14. Подписи к рисункам. Подписи к рисункам представляются на отдельной странице и оформляются следующим образом: Номер рисунка. Общее название рисунка, характеризующее ВСЕ его части. Номер части — описание фотографии (рисунка). Номер следующей части — описание фотографии (рисунка). Обозначения (в алфавитном порядке). Если обозначения расшифрованы в тексте подписи, то давать их в списке обозначений не нужно. Масштаб.

15. Английский перевод основных научных терминов.

16. Английский перевод аннотации, включая название статьи, фамилии авторов и учреждения, электронные адреса, ORCID — коды.

ТРЕБОВАНИЯ К ОБЗОРНОЙ СТАТЬЕ

В обзорной статье не выделяют в самостоятельные разделы Методы исследования, Результаты исследования, Обсуждение результатов. Все остальные разделы те же, что и для экспериментальной статьи. Текст обзора подразделяется на основе смысловых блоков. Во введении авторы должны сформулировать, в чем новизна представленного обзора и какие задачи они ставят в рамках данного обзора. Основной акцент в статье должен быть сделан на критическом рассмотрении работ, опубликованных в последнее десятилетие. Избыточные исторические экскурсы, пересказ ранее опубликованных обзоров не приветствуются. В обзорной статье должно присутствовать заключение, содержащее авторскую оценку ближайших перспектив изучения данной проблемы.

ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСИ

Все строки рукописи должны быть пронумерованы. При ссылке на литературный источник в тексте статьи в круглых скобках приводятся фамилия автора (или двух авторов) и год издания. Если авторов больше двух, то приводится фамилия первого с пометкой “и др.” — для русских или “et al.” — для иностранных авторов.

При ссылке одновременно на несколько работ одного автора они располагаются в хронологическом порядке.

Если после латинского названия организма не приводятся автор таксона и год, но далее следует библиографическая ссылка, то перед ссылкой необходимо использовать “см.”. Например: “...эмбрионального развития *Phoronopsis harmeri* (см.: Temereva, 1999)”, но не “... эмбрионального развития *Phoronopsis harmeri* (Temereva, 1999)”.

Латинские названия видового и родового ранга следует выделять курсивом.

Синонимию приводить в хронологическом порядке, начиная с названия вида, затем указать авторов, год опубликования, страницы и номера рисунков. Например:

Velutina coriacea (Pallas, 1788)

Helix coriacea Pallas, 1788: 234, pl. VII, fig. 31, 32.

Velutina spongiosa Middendorff, 1851: 108, fig. 1–4.

Velutina coriacea: Tryon, 1886: 67, pl. 28, fig. 49, 50; Kuroda, Kinoshita, 1951: 15; Голиков, Кусакин, 1962: 297, табл. I, рис. 5; Голиков, Гульбин, 1990: 119; Gulbin, Golikov, 1999: 235–236, fig. 9.

Velutina pellucida Derjugin: Дерюгин, 1950: 17–18, рис. 13, табл. II, 13; V, 13; Голиков, Гульбин, Сиренко, 1987: 38, табл. II, рис. 15.

Velutina glabrata Golikov et Kussakin: Голиков, Кусакин, 1962: 301, рис. 8, табл. I, фиг. 7; 1978: 146, рис. 102.

При наборе текста статьи необходимо придерживаться следующих правил:

1. При наборе пользуйтесь стандартным Windows TrueType шрифтом Times New Roman. Размер шрифта – 14; не делайте более одного пробела.

2. Для набора формул используйте редактор формул.

3. В десятичных дробях ставится точка: 0.25 вместо 0,25.

4. Используются только “кавычки”.

5. В тексте все даты в виде “число.месяц.год” набираются следующим образом: 02.05.2014 г.

6. Точка не ставится после: УДК, названия статьи, фамилии автора, адреса, заголовков и подзаголовков, названия таблицы, размерностей (ч – час, с – секунда, г – грамм, мин – минута, сут – сутки, град – градус, м – метр), а также в подстрочных индексах ($C_{\text{опт}}$).

7. Точка ставится после: сносок, примечания, подписи к рисунку, краткой аннотации, сокращений (мес. – месяц, нед. – неделя, г. – год).

8. Размерности отделяются от цифры пробелом (760 мм рт. ст., 100 кПа, 77 К, 58 Дж/моль), кроме градусов, процентов, промилле: 90°, 20°C, 50%, 20‰; для написания сложных размерностей используются скобки: Дж/(моль К). Размерности переменных приводятся через запятую (Е, кДж/моль), подлогарифмических величин – в квадратных скобках, без запятой: ln τ [мин].

9. При перечислении, а также в числовых интервалах размерность приводится лишь для последнего числа (18–20°C), за исключением угловых градусов: 5°–10°.

10. Числа с буквами в обозначениях необходимо набирать без пробелов: рис. 1а.

11. В географических координатах широты отделяются пробелами: 56.5° N, 85.0° E.

12. Год, том, номер, страницы в списке литературы разделяются пробелами: 2010. Т. 36. № 2. С. 95–100.

13. Основные часто используемые сокращения: б. – бухта, зал. – залив, о-в – остров, п-в – полуостров, оз. – озеро.