

ISSN 2499-9768 print

МОРСКОЙ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ
MARINE BIOLOGICAL JOURNAL

Том 5 № 2

2020

МОРСКОЙ БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
MARINE BIOLOGICAL JOURNAL

включён в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК Российской Федерации.

Журнал реферируется международной библиографической и реферативной базой данных Scopus (Elsevier),

международной информационной системой по водным наукам и рыболовству ASFA (ProQuest),

Всероссийским институтом научно-технической информации (ВИНИТИ),

а также Российским индексом научного цитирования (РИНЦ) на базе Научной электронной библиотеки elibrary.ru.

Все материалы проходят независимое двойное слепое рецензирование.

Редакционная коллегия

Главный редактор

Егоров В. Н., акад. РАН, д. б. н., проф., ФИЦ ИнБЮМ

Заместитель главного редактора

Солдатов А. А., д. б. н., проф., ФИЦ ИнБЮМ

Ответственный секретарь

Корнийчук Ю. М., к. б. н., ФИЦ ИнБЮМ

Адрианов А. В., акад. РАН, д. б. н., проф.,
ИБМ ДВО РАН

Азовский А. И., д. б. н., проф., МГУ

Генкал С. И., д. б. н., проф., ИБВВ РАН

Денисенко С. Г., д. б. н., ЗИН РАН

Довгаль И. В., д. б. н., проф., ФИЦ ИнБЮМ

Зуев Г. В., д. б. н., проф., ФИЦ ИнБЮМ

Коновалов С. К., чл.-корр. РАН, д. г. н., ФИЦ МГИ

Мильчакова Н. А., к. б. н., ФИЦ ИнБЮМ

Миронов О. Г., д. б. н., проф., ФИЦ ИнБЮМ

Неврова Е. Л., д. б. н., ФИЦ ИнБЮМ

Празукин А. В., д. б. н., ФИЦ ИнБЮМ

Руднева И. И., д. б. н., проф., ФИЦ ИнБЮМ

Рябушко В. И., д. б. н., ФИЦ ИнБЮМ

Самышев Э. З., д. б. н., проф., ФИЦ ИнБЮМ

Совга Е. Е., д. г. н., проф., ФИЦ МГИ

Трапезников А. В., д. б. н., ИЭРиЖ УрО РАН

Финенко З. З., д. б. н., проф., ФИЦ ИнБЮМ

Arvanitidis Chr., D. Sc., HCMR, Greece

Bat L., D. Sc., Prof., Sinop University, Turkey

Ben Souissi J., D. Sc., Prof., INAT, Tunis

Kociolek J. P., D. Sc., Prof., CU, USA

Magni P., D. Sc., CNR-IAS, Italy

Moncheva S., D. Sc., Prof., IO BAS, Bulgaria

Pešić V., D. Sc., Prof., University of Montenegro,
Montenegro

Zaharia T., D. Sc., NIMRD, Romania

Адрес учредителя, издателя и редакции:

ФИЦ «Институт биологии южных морей
имени А. О. Ковалевского РАН».

Пр. Нахимова, 2, Севастополь, 299011, РФ.

Тел.: +7 8692 54-41-10.

E-mail: mbj@imbr-ras.ru.

Сайт журнала: <https://mbj.marine-research.org>.

Адрес соиздателя:

Зоологический институт РАН.

Университетская наб., 1, Санкт-Петербург, 199034, РФ.

Editorial Board

Editor-in-Chief

Egorov V. N., Acad. of RAS, D. Sc., Prof., IBSS

Assistant Editor

Soldatov A. A., D. Sc., Prof., IBSS

Managing Editor

Kornychuk Yu. M., PhD, IBSS

Adrianov A. V., Acad. of RAS, D. Sc., Prof.,
IMB FEB RAS, Russia

Arvanitidis Chr., D. Sc., HCMR, Greece

Azovsky A. I., D. Sc., Prof., MSU, Russia

Bat L., D. Sc., Prof., Sinop University, Turkey

Ben Souissi J., D. Sc., Prof., INAT, Tunis

Denisenko S. G., D. Sc., ZIN, Russia

Dovgal I. V., D. Sc., Prof., IBSS

Finenko Z. Z., D. Sc., Prof., IBSS

Genkal S. I., D. Sc., Prof., IBIW RAS, Russia

Kociolek J. P., D. Sc., Prof., CU, USA

Konovalev S. K., Corr. Member of RAS, D. Sc., Prof.,
MHI RAS, Russia

Magni P., D. Sc., CNR-IAS, Italy

Milchakova N. A., PhD, IBSS

Mironov O. G., D. Sc., Prof., IBSS

Moncheva S., D. Sc., Prof., IO BAS, Bulgaria

Nevrova E. L., D. Sc., IBSS

Pešić V., D. Sc., Prof., University of Montenegro, Montenegro

Prazukin A. V., D. Sc., IBSS

Rudneva I. I., D. Sc., Prof., IBSS

Ryabushko V. I., D. Sc., IBSS

Samyshev E. Z., D. Sc., Prof., IBSS

Sovga E. E., D. Sc., Prof., MHI RAS, Russia

Trapeznikov A. V., D. Sc., IPAE UB RAS, Russia

Zaharia T., D. Sc., NIMRD, Romania

Zuyev G. V., D. Sc., Prof., IBSS

Founder, Publisher and Editorial Office address:

A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas
of Russian Academy of Sciences.

2 Nakhimov ave., Sevastopol, 299011, Russia.

Тел.: +7 8692 54-41-10.

E-mail: mbj@imbr-ras.ru.

Journal website: <https://mbj.marine-research.org>.

Co-publisher address:

Zoological Institute Russian Academy of Sciences.

Universitetskaya emb., 1, St.-Petersburg, 199034, Russia.

МОРСКОЙ БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

MARINE BIOLOGICAL JOURNAL

2020 Том 5 № 2

Основан в феврале 2016 г.

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Выходит 4 раза в год

СОДЕРЖАНИЕ

Научные сообщения

Аганесова Л. О.

Продукционные характеристики копепод *Arctodiaptomus salinus* и *Calanipeda aquaedulcis* при питании смесью микроводорослей Dinophyceae и Prymnesiophyceae 3–11

Беляев Б. Н., Береговая Н. М.

Влияние экзометаболитов моллюска *Mytilus galloprovincialis* на содержание R-фикоэритрина в красной водоросли *Gelidium spinosum* при выращивании в поликультуре 12–18

Захаров Д. В., Йоргенсен Л. Л., Манушин И. Е., Стрелкова Н. А.

Мегабентос Баренцева моря: пространственно-временное распределение и продукционная характеристика (in Eng.) 19–37

Капранова Л. Л., Малахова Л. В., Нехорошев М. В., Лобко В. В., Рябушко В. И.

Состав жирных кислот в трохофорах мидий *Mytilus galloprovincialis*, выращенных в условиях загрязнённости полихлорбифенилами 38–49

Кузнецов А. В., Кулешова О. Н., Пронозин А. Ю., Кривенко О. В., Завьялова О. С.

Действие прямоугольных электрических импульсов низкой частоты на трихоплакса (тип Placozoa) 50–66

Мельник А. В., Мельников В. В., Мельник Л. А., Машукова О. В.

Влияние гребневиков-вселенцев на изменчивость биолюминесценции у берегов Западного Крыма (in Eng.) 67–75

Петров А. Н., Неврова Е. Л.

Оценка неоднородности распределения клеток при токсикологических экспериментах с клоновыми культурами бентосных диатомовых водорослей 76–87

Сапожников Ф. В., Салимон А. И., Корсунский А. М., Калинина О. Ю.,

Сенатов Ф. С., Статник Е. С., Цветинович Ю.

Особенности формирования колониальных поселений морских бентосных диатомей на поверхности синтетического полимера 88–104

Заметки

Баяндина Ю. С.

Реакция личинок *Mnemiopsis leidyi* на изменение освещённости 105–108

Лисицкая Е. В., Болтачева Н. А.

Обнаружение редкого для Чёрного моря вида полихет *Stenodrilus serratus* (Schmidt, 1857) (Annelida, Cirratulidae) (in Eng.) 109–111

Хроника и информация

К юбилею академика РАН Виктора Николаевича Егорова 112–114

МОРСКОЙ БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

MARINE BIOLOGICAL JOURNAL

2020 Vol. 5 no. 2

Established in February 2016

SCIENTIFIC JOURNAL

4 issues per year

CONTENTS

Scientific communications

Aganesova L. O.

Production characteristics of the copepods *Arctodiaptomus salinus* and *Calanipeda aquaedulcis* fed with a mixture of microalgae Dinophyceae and Prymnesiophyceae (in Russ.) 3–11

Belyaev B. N. and Beregovaya N. M.

Influence of mussel *Mytilus galloprovincialis* exometabolites on R-phycoerythrin concentration in red alga *Gelidium spinosum* when grown in polyculture (in Russ.) 12–18

Zakharov D. V., Jørgensen L. L., Manushin I. E., and Strelkova N. A.

Barents Sea megabenthos: Spatial and temporal distribution and production 19–37

Kapranova L. L., Malakhova L. V., Nekhoroshev M. V., Lobko V. V., and Ryabushko V. I.

Fatty acid composition in trochophores of mussel *Mytilus galloprovincialis* grown under contamination with polychlorinated biphenyls (in Russ.) 38–49

Kuznetsov A. V., Kuleshova O. N., Pronozin A. Yu., Krivenko O. V., and Zavyalova O. S.

Effects of low frequency rectangular electric pulses on *Trichoplax* (Placozoa) (in Russ.) 50–66

Melnik A. V., Melnikov V. V., Melnik L. A., and Mashukova O. V.

Influence of invader ctenophores on bioluminescence variability off the coast of Western Crimea 67–75

Petrov A. N. and Nevrova E. L.

Estimation of cell distribution heterogeneity at toxicological experiments with clonal cultures of benthic diatoms (in Russ.) 76–87

Sapozhnikov Ph. V., Salimon A. I., Korsunsky A. M., Kalinina O. Yu.,

Senatov F. S., Statnik E. S., and Cvjetinovic Ju.

Features of formation of colonial settlements of marine benthic diatoms on the surface of synthetic polymer (in Russ.) 88–104

Notes

Baiandina Iu. S.

Response of *Mnemiopsis leidyi* larvae to light intensity changes (in Russ.) 105–108

Lisitskaya E. V. and Boltachova N. A.

The finding of a rare in the Black Sea polychaete *Ctenodrilus serratus* (Schmidt, 1857) (Annelida, Cirratulidae) 109–111

Chronicle and information

To the anniversary of Academician of the RAS Viktor Egorov (in Russ.) 112–114

НАУЧНЫЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 595.34:591.13:582.26/.27

**ПРОДУКЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОПЕПОД
ARCTODIAPTOMUS SALINUS И *CALANIPEDA AQUAEDULCIS*
ПРИ ПИТАНИИ СМЕСЬЮ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ
DINOPHYCEAE И PRYMNESIOPHYCEAE**

© 2020 г. Л. О. Аганесова

Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,
Севастополь, Российская Федерация
E-mail: la7risa@gmail.com

Поступила в редакцию 03.09.2019; после доработки 14.02.2020;
принята к публикации 26.06.2020; опубликована онлайн 30.06.2020.

Убиквитные виды копепод *Arctodiaptomus salinus* (Daday, 1885) и *Calanipeda aquaedulcis* (Krichagin, 1873) — важные компоненты пищевых цепей многочисленных пресных и солёных водоёмов. Данные копеподы пригодны для кормления личинок как морских, так и пресноводных видов рыб, однако влияние питания на продукционные характеристики этих видов копепод изучено недостаточно. Ранее нами было определено, что монокультуры микроводорослей Dinophyceae и Prymnesiophyceae являются оптимальными кормовыми объектами для продуцирования яиц самками *A. salinus* и *C. aquaedulcis*, выживаемости и скорости развития этих копепод на всём протяжении их онтогенеза. Цель данной работы заключалась в определении продукционных характеристик копепод *A. salinus* и *C. aquaedulcis* в оптимальных температурных условиях в зависимости от варианта питания смесью микроводорослей Dinophyceae и Prymnesiophyceae. Наиболее высокие значения выживаемости *A. salinus* от науплиальной до взрослой стадии развития (93–95 %) отмечены при питании копепод монокультурой микроводоросли *Isochrysis galbana* (Parke, 1949) и смесью *I. galbana* + *Prorocentrum cordatum* (Ostenfeld) J. D. Dodge, 1975; наименьшая продолжительность развития (19 суток) — при кормлении смесью из трёх микроводорослей *I. galbana* + *P. cordatum* + *Prorocentrum micans* (Ehrenberg, 1834). Наименьшая средняя продолжительность развития *C. aquaedulcis* от науплиальной до взрослой стадии развития (13 сут.) зафиксирована при питании смесью микроводорослей *I. galbana* + *P. cordatum*. Наименьшая продолжительность науплиального периода развития копепод обоих видов отмечена тогда, когда в состав их диеты входила *I. galbana* в качестве моно- или одного из компонентов смеси. Такая же закономерность сохраняется для копеподитного периода, только уже с *P. cordatum*. Максимальная абсолютная плодовитость *C. aquaedulcis* достигала 24 яиц на самку (*I. galbana*), *A. salinus* — 16 яиц на самку (*P. cordatum*). Выклев *C. aquaedulcis* при питании как монокультурами микроводорослей *P. cordatum* и *I. galbana*, так и их смесью достигал 100 %. Для *A. salinus* только питание самок смесью микроводорослей *I. galbana* + *P. micans* обуславливает максимальный процент выклева.

Ключевые слова: копеподы, *Arctodiaptomus salinus*, *Calanipeda aquaedulcis*, выживаемость, развитие, размножение, микроводоросли, смесь микроводорослей, Dinophyceae, Prymnesiophyceae

В качестве модельных видов для данной экспериментальной работы выбраны два представителя Calanoida — солоноватоводные копеподы *Arctodiaptomus salinus* (Daday, 1885) и *Calanipeda aquaedulcis* (Krichagin, 1873). Одно из главных преимуществ использования этих видов

в качестве объектов питания в аквакультуре — возможность применения их для кормления как морских, так и пресноводных личинок ценных видов рыб, так как оба вида копепод способны выдерживать широкий спектр солёности (до 50–60 ‰) [4]. Среди других технологических преимуществ можно выделить то, что у этих видов, в отличие от морских Calanoida, например рода *Acartia*, отсутствует каннибализм (взрослые копеподы не выедают ни собственные яйца, ни ранние науплиальные стадии), вследствие чего науплиальные, копепоидитные и взрослые стадии можно выращивать совместно.

Основными критериями пищевой ценности микроводорослей для копепод являются: длительность развития особей при питании одним и тем же видом микроводорослей; выживаемость на протяжении эмбрионального развития (процент выклева); успешность линек при переходе от одной жизненной стадии к другой; успешность метаморфоза при переходе от последней науплиальной стадии к первой копепоидитной; время достижения половозрелости; плодовитость самок (скорость продуцирования ими яиц); выживаемость до питающейся науплиальной стадии; успешный переход науплиев на экзогенное питание.

Результаты наших предыдущих исследований [1 ; 3] показали, что монокультуры микроводорослей Dinophyceae и Prymnesiophyceae являются оптимальными кормовыми объектами для продуцирования яиц самками *A. salinus* и *C. aquaedulcis*, выживаемости и скорости развития этих копепод на всём протяжении онтогенеза. Нами выделены температурные оптимумы культивирования копепод (+20...+22 °С для *A. salinus* и +20...+26 °С для *C. aquaedulcis* [2]), при которых существенно сокращается общая продолжительность развития и достигаются наиболее высокие значения показателей выживаемости и плодовитости особей.

Целью данной работы было определить продукционные характеристики копепод *A. salinus* и *C. aquaedulcis* в оптимальных температурных условиях при питании смесью микроводорослей Dinophyceae и Prymnesiophyceae.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на лабораторных культурах копепод *A. salinus* и *C. aquaedulcis* при температуре ($21 \pm 1,5$) °С. В качестве корма для *A. salinus* использовали смесь микроводорослей Prymnesiophyceae (*Isochrysis galbana* Parke, 1949, 3–6 мкм) и Dinophyceae (*Prorocentrum cordatum* (Ostenfeld) J. D. Dodge, 1975, 12–14 мкм; *Prorocentrum micans* Ehrenberg, 1834, 28–42 мкм). Для *C. aquaedulcis* использовали смесь микроводорослей *I. galbana* + *P. cordatum*. Концентрацию пищи поддерживали на уровне 0,02–0,08 мг сух. массы·мл⁻¹ (соотношение микроводорослей в смеси уравнивали по сухому весу её компонентов). Используемые в экспериментах микроводоросли выращивали в накопительном режиме на основе стерилизованной черноморской воды, обогащённой средой Уолна [7], при температуре ($24 \pm 1,5$) °С и круглосуточном освещении интенсивностью 5 тыс. лк. Адаптацию копепод к питанию микроводорослями определённой смеси проводили в течение минимум двух-трёх недель.

В качестве культуральной среды (суспензия микроводорослей в стерилизованной морской воде) для копепод применяли воду Чёрного моря [(17,8 ± 0,2) ‰], прошедшую грубую очистку, отстаивную, затем механически очищенную последовательной фильтрацией через картриджные фильтры (размер пор — 10, 5 и 1 мкм), стерилизованную с помощью ультрафиолета и двукратно пастеризованную. Для экспериментов использовали стеклянные сосуды цилиндрической формы (объём — 50 мл), которые находились в условиях круглосуточного освещения интенсивностью 2000 лк. Полную замену культуральной среды в экспериментальных сосудах производили каждые два-три дня.

Для исследования длительности жизненного цикла копепод, выживаемости и соотношения полов из лабораторных культур *C. aquaedulcis* и *A. salinus*, адаптированных к питанию смесью микроводорослей определённого вида, отсаживали по 15 выклюнувшихся науплиусов

N1 (см. объяснение ниже) (6 повторностей для каждой смеси микроводорослей) каждого вида копепоид в 50-мл сосуды с культуральной средой. Эксперименты проводили при плотности копепоид в сосудах $0,3 \text{ экз.}\cdot\text{мл}^{-1}$.

Выживаемость копепоид оценивали как процент особей, выживших при прохождении всех стадий от первой науплиальной (N1) до половозрелой (C6). Продолжительность развития копепоид устанавливали как средний временной интервал развития особей от N1 до достижения C6.

В экспериментах по определению репродуктивных характеристик *A. salinus* и *C. aquaedulcis* из лабораторных культур копепоид, адаптированных к питанию определённой смесью микроводорослей, в 50-мл стеклянные сосуды цилиндрической формы отсаживали по 1 самке с яйцами ($n = 25$ для каждой смеси микроводорослей) каждого вида копепоид. Подсчитывали количество яиц в кладке (абсолютная плодовитость) и выклюнувшихся жизнеспособных науплиев (% выклева). Все наблюдения за копеподами (каждые 1–3 дня) осуществляли прижизненно с помощью микроскопа МБС-12 при увеличении 2×8 и 4×8 .

Для сравнения использованы данные по репродуктивным характеристикам копепоид *A. salinus* и *C. aquaedulcis* при питании монокультурами микроводорослей Dinophyceae и Prymnesiophyceae, полученные нами в предыдущих работах [1 ; 3].

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

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выживаемость копепоид *C. aquaedulcis* и *A. salinus* на протяжении линек от стадии N1 до C6 варьировала в зависимости от вида микроводорослей, которыми они питаются.

Процент выживаемости *C. aquaedulcis* составлял 92,5 % при кормлении *P. cordatum*; 83 % при питании *I. galbana*; 89 % при кормлении смесью *I. galbana* + *P. cordatum* (рис. 1). Минимальную выживаемость *A. salinus* на протяжении всех линек от стадии N1 до C6 (68,6 %) наблюдали при питании *P. cordatum*; максимальную — при кормлении *I. galbana* (94,5 %) и смесью микроводорослей *I. galbana* + *P. cordatum* (93 %) (рис. 1).

Выявлено влияние вида микроводоросли на длительность развития стадий копепоид (рис. 2). При кормлении микроводорослями *I. galbana* и *P. cordatum* продолжительность развития копепоид *C. aquaedulcis* составила 14 суток, а при питании смесью *I. galbana* + *P. cordatum* — 13 сут. Наименьшая продолжительность науплиального периода развития копепоид (6 сут.) получена при кормлении *I. galbana* и *I. galbana* + *P. cordatum*. Наименьшая продолжительность копепоидитного периода развития *C. aquaedulcis* (C1–5) (7 сут.) получена при питании *P. cordatum* и *I. galbana* + *P. cordatum*.

Продолжительность развития от первого науплиуса до взрослой стадии копепоид другого вида — *A. salinus* — оказалась значительно больше, чем продолжительность развития *C. aquaedulcis*, при кормлении любыми предложенными видами микроводорослей. Продолжительность развития *A. salinus* при питании как монокультурами *I. galbana* и *P. cordatum*, так и смесью *I. galbana* + *P. cordatum* составила 20 сут. Наименьшей (19 сут.) продолжительность развития была при кормлении смесью трёх микроводорослей *I. galbana* + *P. cordatum* + *P. micans*. При питании смесью *I. galbana* + *P. micans* и монокультурой *P. micans* продолжительность развития копепоид увеличивалась до 21 и 22 сут. соответственно. Наибольшую продолжительность (25 сут.) наблюдали при кормлении смесью *P. cordatum* + *P. micans*.

Наименьшая продолжительность науплиального периода развития *A. salinus* составила 7 сут. (при питании *I. galbana* и смесями микроводорослей *I. galbana* + *P. cordatum* + *P. micans* и *I. galbana* + *P. micans*), а наибольшая — 10 сут. (при кормлении *P. cordatum* + *P. micans*). Наименьшая продолжительность копепоидитного периода развития *A. salinus* (C1–5) составила 12 сут. (при питании *P. cordatum* и смесями *I. galbana* + *P. cordatum* + *P. micans* и *I. galbana* + *P. cordatum*), а наибольшая — 15 сут. (при кормлении *P. cordatum* + *P. micans*).

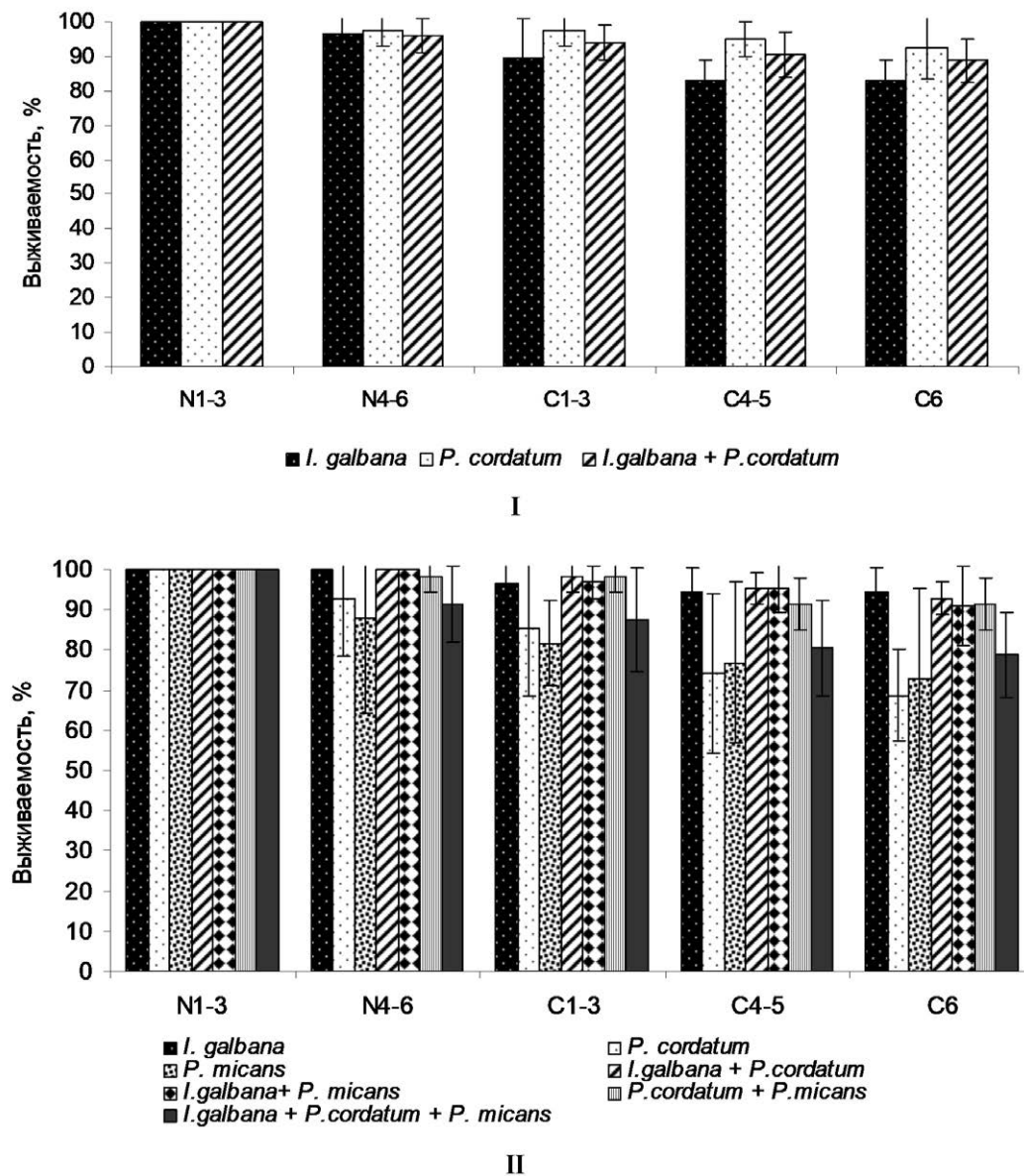


Рис. 1. Выживаемость копепод *Calanipeda aquaedulcis* (I) и *Arctodiaptomus salinus* (II) в эксперименте в зависимости от питания микроводорослями разных видов (M ; 95 % CI; $n = 15$)

Fig. 1. Survival rate of *Calanipeda aquaedulcis* (I) and *Arctodiaptomus salinus* (II) in the experiment depending on being fed with various microalgae species (M ; 95 % CI; $n = 15$)

Процентное соотношение полов при достижении взрослой стадии копепод *A. salinus* и *C. aquaedulcis* также варьировало в зависимости от вида микроводорослей, которыми они питались (табл. 1). Для *C. aquaedulcis* наименьший процент самцов (21 %) получен (достоверно) при кормлении копепод *I. galbana*; при питании *P. cordatum* и смесью *I. galbana* + *P. cordatum* их доля возрастала до 43 %. Для *A. salinus* наибольший процент самцов (70 %) получен (недостоверно) при кормлении копепод смесью *I. galbana* + *P. micans*, а наименьший (45–48 %) — при питании монокультурами *P. micans* и *P. cordatum*.

У копепод *C. aquaedulcis* средняя величина абсолютной плодовитости незначительно варьировала в пределах от ($19,3 \pm 3,2$) яиц на самку (при кормлении *I. galbana* + *P. cordatum*) до ($24,2 \pm 1,8$) (*I. galbana*). Выклев при питании как монокультурами микроводорослей *P. cordatum* и *I. galbana*, так и их смесью достигал 100 % (рис. 3).

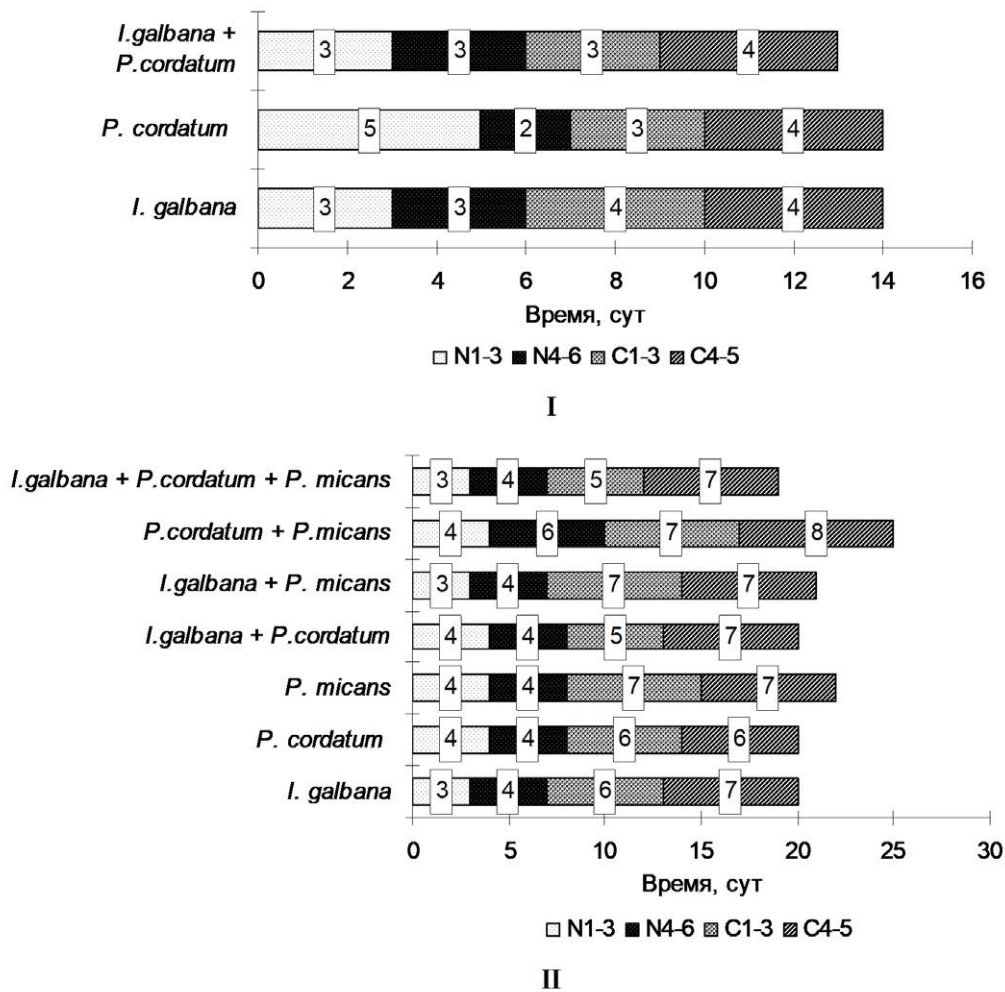


Рис. 2. Длительность развития *Calanipeda aquaedulcis* (I) и *Arctodiaptomus salinus* (II) в эксперименте в зависимости от питания микроводорослями разных видов (M ; $n = 15$)

Fig. 2. Development time of *Calanipeda aquaedulcis* (I) and *Arctodiaptomus salinus* (II) in the experiment depending on being fed with various microalgae species (M ; $n = 15$)

Таблица 1. Процентное соотношение самцов (M) и самок (F) копепоид *Calanipeda aquaedulcis* и *Arctodiaptomus salinus* при питании микроводорослями разных видов ($M \pm SD$; $n = 15$) (95 % CI)

Table 1. Percentage of males (M) and females (F) of copepods *Calanipeda aquaedulcis* and *Arctodiaptomus salinus* when being fed with various microalgae species ($M \pm SD$; $n = 15$) (95 % CI)

Микроводоросли	<i>C. aquaedulcis</i>		<i>A. salinus</i>	
	M, %	F, %	M, %	F, %
<i>I. galbana</i>	20,8 ± 8,3	79,2 ± 8,3	56,1 ± 12,7	43,9 ± 12,7
<i>P. cordatum</i>	42,7 ± 6,3	57,3 ± 6,3	47,7 ± 10	52,3 ± 10
<i>P. micans</i>	–	–	45 ± 2,3	55 ± 2,3
<i>I. galbana</i> + <i>P. cordatum</i>	43,3 ± 9,3	56,7 ± 9,3	61 ± 5,9	39 ± 5,9
<i>I. galbana</i> + <i>P. micans</i>	–	–	70,1 ± 12,3	29,9 ± 12,3
<i>P. cordatum</i> + <i>P. micans</i>	–	–	59,1 ± 12,4	40,9 ± 12,4
<i>I. galbana</i> + <i>P. cordatum</i> + <i>P. micans</i>	–	–	52,8 ± 12,7	47,2 ± 12,7

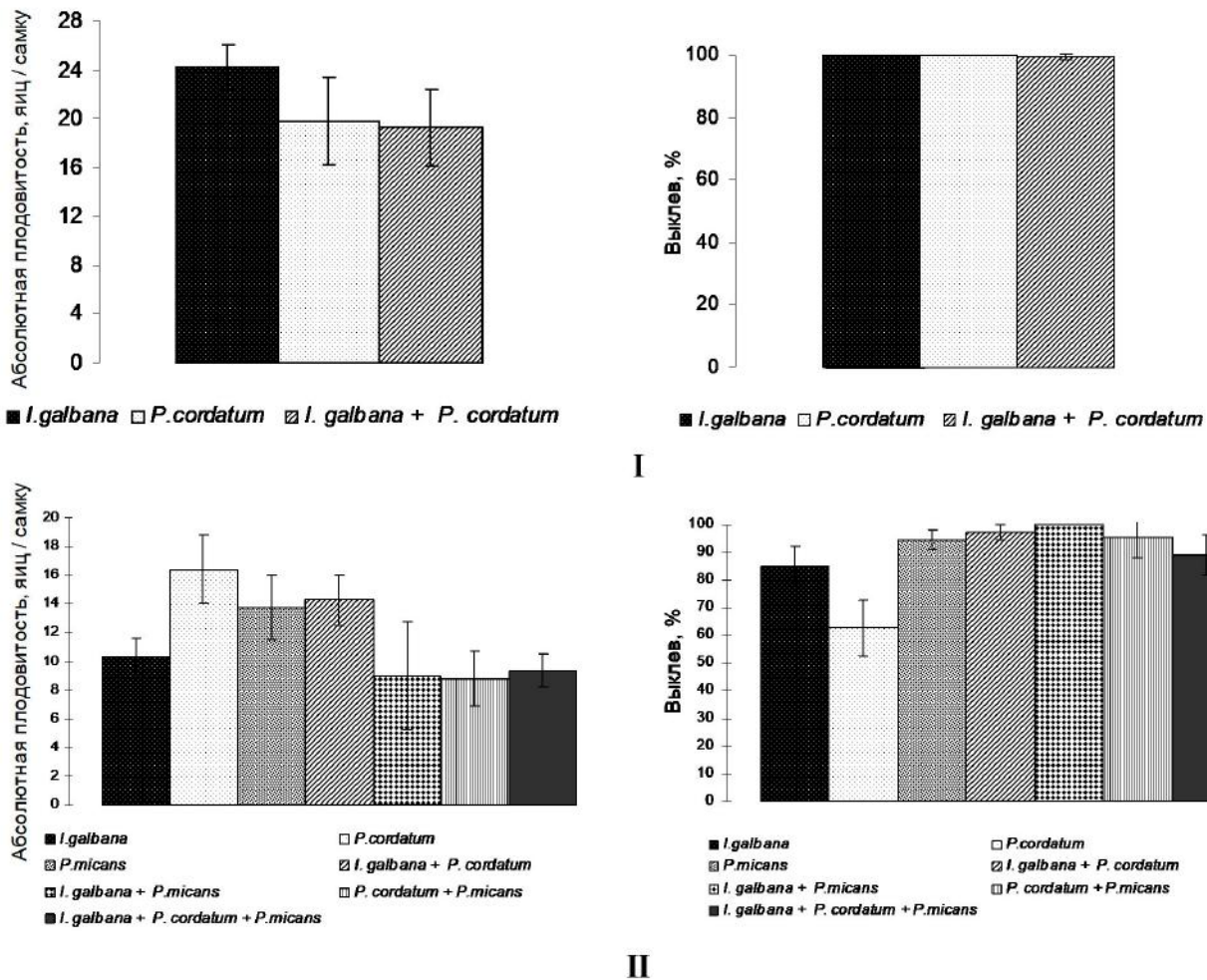


Рис. 3. Сравнительные диаграммы абсолютной плодовитости и доли выклева жизнеспособных науплиев от общего количества яиц у самок копепоид *Calanipeda aquaedulcis* (I) и *Arctodiaptomus salinus* (II) при питании микроводорослями разных видов ($M \pm SD$; $n = 15$) (95 % CI)

Fig. 3. Comparative diagrams of absolute fecundity and hatching rate of viable nauplii from the total number of eggs of females of copepods *Calanipeda aquaedulcis* (I) and *Arctodiaptomus salinus* (II) when being fed with various microalgae species ($M \pm SD$; $n = 15$) (95 % CI)

Обнаружены достоверные различия во влиянии вида микроводорослей на абсолютную плодовитость *A. salinus*. Значение показателя было минимальным (от $8,8 \pm 1,9$ до $10,3 \pm 1,3$) яиц на самку при кормлении *P. cordatum* + *P. micans*; *I. galbana* + *P. cordatum* + *P. micans*; *I. galbana* + *P. micans*; *I. galbana*; значение было максимальным (от $13,75 \pm 2,3$ до $16,4 \pm 2,4$) яиц на самку при питании копепоид *P. micans*; *I. galbana* + *P. cordatum*; *P. cordatum*.

Наиболее выраженное влияние трофические условия (хемотаксономические характеристики, связанные с видом и классом микроводорослей, которыми питались самки копепоид) оказывали на эмбриональное развитие копепоид *A. salinus*, норму которого характеризует процент выклева из яиц жизнеспособных науплиев. Этот показатель достоверно был минимальным [$62,63 \pm 10$ %] при питании самок *A. salinus* микроводорослями *P. cordatum*. Затем значение процента выклева науплиев варьировало (недостоверно) от $84,9 \pm 7,3$ до $97,46 \pm 2,7$ %, достигая максимума (100 %) при питании *I. galbana* + *P. micans*.

ОБСУЖДЕНИЕ

При сравнении значений выживаемости и продолжительности развития *C. aquaedulcis* и *A. salinus* обнаружено сходство влияния некоторых видов микроводорослей на показатели копепоид.

Наименьшая продолжительность науплиального периода развития обоих видов отмечена тогда, когда в состав их диеты входила *I. galbana* в качестве моно- или одного из компонентов смеси. Такая закономерность сохраняется и для копеподитного периода, только уже с *P. cordatum*.

Кормление мелкоразмерными *I. galbana* оказалось оптимальным для развития науплиальных стадий, однако такое питание задерживало развитие копеподитных стадий по сравнению с питанием крупноразмерными *P. cordatum*. Сокращённая длительность развития в течение науплиального периода при кормлении *I. galbana* нивелируется сокращённой длительностью развития в течение копеподитного периода при питании *P. cordatum*. Таким образом, общая продолжительность развития (науплиальный плюс копеподитный периоды) оказалась наименьшей для *C. aquaedulcis* при питании смесью *I. galbana* + *P. cordatum* (13 сут.), а для *A. salinus* — при кормлении *I. galbana* + *P. cordatum* + *P. micans* (19 сут.).

Известно, что у большинства каляноидных копепод самки всегда больше самцов; меньшие размеры самцов Calanoida обычно связаны с их более быстрым развитием [6]. Согласно гипотезе [11], под воздействием неблагоприятных условий окружающей среды можно ожидать смещения соотношения полов в сторону преобладания самцов, а при благоприятных условиях — в сторону самок. В случае с *C. aquaedulcis* и *A. salinus* самцы меньше самок. Следовательно, если гипотеза верна, смещение соотношения полов в сторону самцов может свидетельствовать о неоптимальных условиях окружающей среды — экстремальных температурах и/или высокой солёности либо неадекватной обеспеченности пищей. Вероятно, биохимический состав пищи может оказывать влияние и на дифференциацию пола развивающихся копепод, как это определено для других гидробионтов [13]. На численное соотношение полов взрослых *Calanus* spp. влияют концентрация и качество пищи: увеличение доли самок наблюдают с повышением концентрации пищи в среде, в которой происходит развитие копепод [8]. При этом полученные данные по предполагаемому нами влиянию хемотаксономических характеристик микроводорослей на соотношение полов в экспериментальных популяциях копепод требуют дополнительных комплексных исследований их биологии, совмещённых с изучением биохимического состава микроводорослей и питающихся ими копепод.

Хемотаксономический состав микроводорослей, которыми питаются самки копепод, безусловно, оказывает влияние на их репродуктивные характеристики и особенно на жизнеспособность науплиусов обоих видов при выклеве. В наших экспериментах максимальный процент выклева (100 %) науплиусов наблюдали при питании самок *C. aquaedulcis* как монокультурами *I. galbana* и *P. cordatum*, так и смесью этих микроводорослей. Между тем для *A. salinus* обнаружены некоторые отличия во влиянии вида микроводорослей на выживаемость науплиев при выклеве. Так, при кормлении *P. cordatum* получены минимальный процент выклева науплиусов *A. salinus* и максимальная абсолютная плодовитость самок.

Микроводоросли Dinophyceae характеризуются высоким содержанием высоконенасыщенных жирных кислот с преобладанием докозагексаеновой (далее — ДГК) над эйкозапентаеновой (далее — ЭПК) [12], а Prymnesiophyceae — повышенным содержанием ДГК с низким содержанием ЭПК [10]. Содержание и соотношение ДГК и ЭПК в составе микроводорослей — это, предположительно, один из основных хемотаксономических факторов, оказывающих влияние на репродукционные характеристики каляноидных копепод [5 ; 9]. Сбалансированное присутствие ДГК и ЭПК в микроводорослевой диете на всём протяжении онтогенеза копепод оказывает положительное воздействие на скорость развития *C. aquaedulcis* и *A. salinus*. В то же время питание самок смесью микроводорослей Dinophyceae и Prymnesiophyceae обуславливает максимальный процент выклева науплиусов обоих видов копепод.

Заключение. Наиболее высокие значения выживаемости *A. salinus* от науплиальной до взрослой стадии развития (93–95 %) получены при питании копепод монокультурой микроводоросли *I. galbana* и смесью *I. galbana* + *P. cordatum*, наименьшая продолжительность развития (19 сут.) —

при кормлении смесью из трёх микроводорослей *I. galbana* + *P. cordatum* + *P. micans*. Наименьшая средняя продолжительность развития *C. aquaedulcis* от науплиальной до взрослой стадии развития (13 сут.) отмечена при питании смесью микроводорослей *I. galbana* + *P. cordatum*.

Для копепод *C. aquaedulcis* наименьший процент самцов (21 %) получен достоверно при питании *I. galbana*; при питании *P. cordatum* и смесью *I. galbana* + *P. cordatum* их доля возростала до 43 %. У *A. salinus* достоверных отличий процентного соотношения полов при достижении взрослой стадии в зависимости от вида микроводорослей не выявлено.

Наименьшая продолжительность науплиального периода развития копепод обоих видов отмечена тогда, когда в состав их диеты входила *I. galbana* в качестве моно- или одного из компонентов смеси. Эта закономерность сохраняется и для копеподитного периода, только уже с *P. cordatum*.

Максимальная абсолютная плодовитость *C. aquaedulcis* достигала 24 яиц на самку (*I. galbana*), *A. salinus* — 16 яиц на самку (*P. cordatum*). Выклев *C. aquaedulcis* при питании как монокультурами микроводорослей *P. cordatum* и *I. galbana*, так и их смесью достигал 100 %. Для *A. salinus* только питание самок смесью микроводорослей *I. galbana* + *P. micans* обуславливает максимальный процент выклева.

Следовательно, смеси микроводорослей *P. cordatum* + *I. galbana* (для *C. aquaedulcis*) и *I. galbana* + *P. cordatum* + *P. micans* (для *A. salinus*), благодаря сбалансированному присутствию эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот, были определены как оптимальные кормовые объекты для выживаемости и скорости развития копепод на всём протяжении онтогенеза, а также обусловили максимальный процент выклева жизнеспособных науплиев.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса» (№ гос. регистрации АААА-А18-118021350003-6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Аганесова Л. О. Выживаемость и длительность развития копепод *Calanipeda aquaedulcis* и *Arctodiaptomus salinus* в зависимости от питания микроводорослями разных таксономических групп // *Морской экологический журнал*. 2011. Т. 10, № 2. С. 27–33. [Aganesova L. O. Survival and development times of the copepods *Calanipeda aquaedulcis* and *Arctodiaptomus salinus* depending on feeding microalgae of different taxonomic groups. *Morskoj ekologicheskij zhurnal*, 2011, vol. 10, iss. 2, pp. 27–33. (in Russ.)]
- Аганесова Л. О. Длительность развития копепод *Calanipeda aquaedulcis* и *Arctodiaptomus salinus* при разном температурном режиме культивирования // *Морской экологический журнал*. 2013. Т. 12, № 1. С. 19–25. [Aganesova L. O. Development times of the copepods *Calanipeda aquaedulcis* and *Arctodiaptomus salinus* at different temperatures. *Morskoj ekologicheskij zhurnal*, 2013, vol. 12, no. 1, pp. 19–25. (in Russ.)]
- Аганесова Л. О. Репродуктивные характеристики самок копепод *Calanipeda aquaedulcis* и *Arctodiaptomus salinus* при питании микроводорослями разных таксономических групп // *Морской экологический журнал*. 2011. Отд. вып. № 2. С. 7–10. [Aganesova L. O. Reproductive characteristics of females of the copepods *Calanipeda aquaedulcis* and *Arctodiaptomus salinus* fed microalgae from different taxonomic groups. *Morskoj ekologicheskij zhurnal*, 2011, spec. iss. no. 2, pp. 7–10. (in Russ.)]
- Губарева Е. С., Светличный Л. С. Солёностная толерантность копепод *Calanipeda aquaedulcis* и *Arctodiaptomus salinus* (Calanoida, Copepoda) // *Морской экологический журнал*. 2011. Т. 10, № 4. С. 32–39. [Hubareva E. S., Svetlichny L. S. Salinity tolerance of copepods *Calanipeda aquaedulcis* and *Arctodiaptomus salinus* (Calanoida, Copepoda). *Morskoj ekologicheskij zhurnal*, 2011, vol. 10, iss. 4, pp. 32–39. (in Russ.)]
- Ханайченко А. Н. Влияние микроводорослевой диеты на характеристики воспроизводства копепод // *Экология моря*. 1999. Вып. 49. С. 56–61. [Khanaychenko A. N. The effect of microalgal diet on copepod reproduction parameters. *Ekologiya morya*, 1999, iss. 49, pp. 56–61. (in Russ.)]

6. Corkett C. J., McLaren I. A., Sevigly J.-M. The rearing of the marine calanoid copepods *Calanus finmarchicus* (Gunnerus), *C. glacialis* Jaschnov, and *C. hyperboreus* Kroyer with comment on the equiproportional rule. *Sillogeus*, 1986, vol. 58, pp. 539–546.
7. Coutteau P. *Micro-Algae. Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture* / P. Lavens, P. Sorgeloos (Eds). Rome : FAO, 1996, 300 p. (FAO Fisheries Technical Paper ; no. 361).
8. Irigoien X., Obermuller B., Head R. N., Harris R. P., Rey C., Hansen B. W., Hygum B. H., Heath M. R., Durbin E. G. The effect of food on the determination of sex ratio in *Calanus* spp.: Evidence from experimental studies and field data. *ICES Journal of Marine Science*, 2000, vol. 57, iss. 6, pp. 1752–1763. <https://doi.org/10.1006/jmsc.2000.0960>
9. Lacoste A., Poulet S. A., Cueff A., Kattner G., Ianora A., Laabir M. New evidence of the copepod maternal food effects on reproduction. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2001, vol. 259, iss. 1, pp. 85–107. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(01\)00224-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00224-6)
10. Payne M. F., Rippengale R. J. Evaluation of diets for culture of the calanoid copepod *Gladiferens imparipes*. *Aquaculture*, 2000, vol. 187, iss. 1, pp. 85–96. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00391-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00391-9)
11. Sapir Y., Mazer S. J., Holzapfel C. Sex ratio. *Jorgensen Encyclopedia of Ecology*, 2008, vol. 4, pp. 3243–3248. <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00658-3>
12. Zhukova N. V., Aizdaicher N. A. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry*, 1995, vol. 39, iss. 2, pp. 351–356. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00913-E](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00913-E)
13. Zupo V. Influence of diet on sex differentiation of *Hippolyte inermis* Leach (Decapoda: Natantia) in the field. *Hydrobiologia*, 2001, vol. 449, iss. 1–3, pp. 131–140. https://doi.org/10.1007/978-94-017-0645-2_13

**PRODUCTION CHARACTERISTICS OF THE COPEPODS
ARCTODIAPTOMUS SALINUS AND CALANIPEDA AQUAEDULCIS
BEING FED WITH A MIXTURE OF MICROALGAE
DINOPHYCEAE AND PRYMNESIOPHYCEA**

L. O. Aganesova

A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation
E-mail: la7risa@gmail.com

The ubiquitous copepod species *Arctodiaptomus salinus* (Daday, 1885) and *Calanipeda aquaedulcis* (Krichagin, 1873) are important components of food chains of numerous fresh- and saltwater areas. These copepods are suitable for feeding larvae of both marine and freshwater fish species; however, influence of nutrition on the production characteristics of these species is not well understood. Previously we determined that monocultures of microalgae Dinophyceae and Prymnesiophyceae are optimal feeding objects for egg production by females of *A. salinus* and *C. aquaedulcis*, survival rate, and development time of these copepods throughout ontogenesis. The aim of this work was to determine the production characteristics of copepods *A. salinus* and *C. aquaedulcis* under optimal temperature conditions depending on the model of the feeding with a mixture of microalgae Dinophyceae and Prymnesiophyceae. The highest survival rates of *A. salinus* from the naupliar stage to the adult one (93–95 %) were observed when copepods were fed with a monoculture of microalga *Isochrysis galbana* (Parke, 1949) or a mixture *I. galbana* + *Prorocentrum cordatum* (Ostenfeld) J. D. Dodge, 1975; the shortest development time (19 days) – when copepods were fed with a mixture of three microalgae *I. galbana* + *P. cordatum* + *Prorocentrum micans* (Ehrenberg, 1834). The shortest development time of *C. aquaedulcis* from the naupliar stage to the adult one (13 days) was observed when copepods were fed with a mixture of microalgae *I. galbana* + *P. cordatum*. The shortest duration of the naupliar stage of development of both copepod species was observed when their diet included *I. galbana* as a monoculture or one of mixture components. During the copepodit stage, the pattern remains the same, only with *P. cordatum*. The maximum absolute fecundity of *C. aquaedulcis* reached 24 eggs per female (*I. galbana*), of *A. salinus* – 16 eggs per female (*P. cordatum*). Egg hatching of *C. aquaedulcis* when being fed with both monocultures of microalgae *P. cordatum* and *I. galbana* and with their mixture reached 100 %. The highest egg hatching rate for *A. salinus* was reached only when copepod females were fed with a mixture of microalgae *I. galbana* + *P. micans*.

Keywords: copepods, *Arctodiaptomus salinus*, *Calanipeda aquaedulcis*, survival, development, reproduction, microalgae, mixture of microalgae, Dinophyceae, Prymnesiophyceae

УДК 582.273:594.124:577.1

**ВЛИЯНИЕ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ МОЛЛЮСКА *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*
НА СОДЕРЖАНИЕ R-ФИКОЭРИТРИНА
В КРАСНОЙ ВОДОРОСЛИ *GELIDIUM SPINOSUM*
ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ В ПОЛИКУЛЬТУРЕ**

© 2020 г. Б. Н. Беляев, Н. М. Береговая¹

¹Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,
Севастополь, Российская Федерация
E-mail: belyaevbob@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.10.2019; после доработки 14.11.2019;
принята к публикации 26.06.2020; опубликована онлайн 30.06.2020.

Приведены результаты исследований культивирования красной черноморской водоросли *Gelidium spinosum* (S. G. Gmelin) P. C. Silva, 1996 (Rhodophyta) в лабораторных условиях в поликультуре микроводоросль *Tetraselmis viridis* — мидия *Mytilus galloprovincialis* — гелидиум с целью повышения концентрации R-фикоэритрина в последнем. Описано положительное влияние экзосметаболитов мидий на концентрацию R-фикоэритрина в гелидиуме в поликультуре. Актуальность работы определяется ценностью фикоэритрина, который используют как мощный антиоксидант, а также как метчик в цитометрии и микроскопии. Цель исследования — увеличить концентрацию R-фикоэритрина в гелидиуме с применением метода поликультуры. В качестве материала использовали гелидиум из обрастания скал и берегоукрепительных сооружений в районе бухты Карантинная (г. Севастополь); его культивировали в лабораторной установке с восемью рабочими объёмами, в четырёх из которых содержали мидий. Деконтат мидий, дополненный минеральными солями и биогенами, использовали как питательную среду для гелидиума. Сочетание экзосметаболитов мидий с разработанной ранее питательной средой на основе черноморской воды, обогащённой биогенами и минеральными солями, приводит к увеличению содержания R-фикоэритрина более чем вдвое, в то время как внесение экзосметаболитов в чистую профильтрованную черноморскую воду повышает его максимум на 35 %. Ориентировочные весовые соотношения элементов поликультуры в 1,5-литровых объёмах, позволяющие достичь желаемого результата уже через две недели, — это 2 г гелидиума / 50–60 г двухлетних мидий / 0,4–0,6 г сырого веса микроводорослей.

Ключевые слова: культивирование, поликультура, микроводоросли, моллюски, макрофиты, питательная среда

Черноморский гелидиум *Gelidium spinosum* (S. G. Gmelin) P. C. Silva, 1996 является ценным сырьевым источником особо качественного агара и R-фикоэритрина — пигмента-фикобилипротеина, который широко используется в иммунной диагностике, микроскопии и цитометрии [13]. Водоросли, содержащие агар и R-фикоэритрин, — объект культивирования во многих странах Азиатско-Тихоокеанского региона [9 ; 14], при этом стоимость 1 г очищенного R-фикоэритрина достигает 3250–14000 долларов [12].

Нами в предыдущие годы проведены работы по определению оптимальных условий для роста гелидиума и накопления в нём R-фикоэритрина — концентраций минеральных солей и биогенов, светового и температурного режимов, насыщения углекислым газом питательной среды, а также скорости её протока и циркуляции [2].

Известно, что в природных условиях гелидиум часто встречается как эпибионт моллюсков-фильтраторов. Такой симбиоз вызван положительным влиянием экзометаболитов моллюсков на рост макрофита, в связи с чем получило развитие выращивание гидробионтов в поликультуре [7 ; 14].

Ранее нами получены результаты, указывающие на благоприятное воздействие экзометаболитов анадары *Anadara kagoshimensis*, голодающей в чистой черноморской воде в течение 15 суток, на рост гелидиума и содержание в нём R-фикоэритрина. При возрастании биомассы гелидиума на 11,6 % содержание R-фикоэритрина по сравнению с контролем увеличилось на 40 % [4].

Цель работы — повысить концентрацию R-фикоэритрина при культивировании гелидиума в поликультуре. Для этого поставлена следующая задача: определить оптимальное соотношение элементов поликультуры микроводоросль — мидия — макрофит.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве материала использовали *Gelidium spinosum* из обрастаний скал и берегоукрепительных сооружений в районе севастопольских бухт Мартынова и Карантинная, который культивировали в лабораторной установке с восемью рабочими объёмами [1] при температуре в диапазоне +15...+27 °С и освещённости 10–25 клк в режиме 18 ч день : 6 ч ночь. Питательную среду готовили на основе фильтрованной черноморской воды с повышением её солёности до 26 ‰ и добавлением азота, фосфора, железа, магния и марганца [3]. Мидий (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) размером 45–50 мм снимали с коллекторов фермы, расположенной южнее входа в бух. Севастопольская, напротив радиобиологического корпуса ФИЦ ИнБЮМ. Микроводоросли культивировали отдельно в плоском культиваторе.

Четыре из восьми рабочих объёмов установки с правонаклонным дном были модернизированы под содержание мидий — перегородены левонаклонными перфорированными полками для посадки от двух до шести особей со средним весом 9,5–11,5 г. Постоянный барботаж объёмов установки воздухом регулировали так, чтобы фекалии моллюсков не взмучивались и оставались в заглубленной части дна.

Мидий от одного-двух раз в сутки до одного раза в двое суток кормили взвесью культуры *Tetraselmis viridis* (Rouchijajnen) R. E. Norris, Hori & Chihara, 1980 из музея отдела биотехнологий и фиторесурсов ФИЦ ИнБЮМ плотностью 12–17 мг сырого веса микроводорослей на 1 мл в пределах 5–35 мл на один объём. Содержимое объёмов с мидиями один раз в двое суток полностью сливали в предварительно осушенные ёмкости с гелидиумом, куда добавляли набор минералов и биогенов [2]. Измерения концентрации R-фикоэритрина в гелидиуме проводили по стандартной методике [10] один раз в неделю и в конце эксперимента. Исходный вес макрофита составлял $(2,00 \pm 0,05)$ г в каждом рабочем объёме. Для измерений использовали весы Sartorius L 220 S.

Исследования проводили в осенние и зимние периоды. В первом эксперименте в сосуды с гелидиумом сливали деконтат из объёмов с мидиями (по 4 экземпляра в каждом), которых содержали в чистой профильтрованной морской воде, доведённой до солёности 26 ‰, и кормили микроводорослью *Tetraselmis viridis*. Таким образом, питанием для гелидиума, без минерализации среды, как и в эксперименте с анадарой [4], служили исключительно метаболиты мидий.

Во втором эксперименте слитый деконтат насыщали компонентами разработанной ранее питательной среды: азотом ($8,54 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ в виде KNO_3); фосфором ($1,77 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ в виде KH_2PO_4); железом ($1,39 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ в виде $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в сочетании с 17 мг $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ на 1 г соли); марганцем ($0,55 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ в виде $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$); магнием ($120 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ в виде $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) [2]. В каждый из четырёх модернизированных объёмов установки помещали по 4 мидии со средним весом 9,5–11,5 г, а в четыре других объёма — по $(2 \pm 0,05)$ г гелидиума. Мидий кормили микроводорослью — 5–20 мл суспензии в сутки.

Первые два эксперимента проводили в соответствии с нашим патентом [3] с элементом недельного «дозревания» гелидиума для повышения концентрации R-фикоэритрина. В третьем эксперименте из-за еженедельного измерения концентрации пигмента этот элемент был исключён.

В третьем эксперименте, как и во втором, гелидиум выращивали на деконтате мидий с добавлением минералов и биогенов. Для выявления динамики накопления пигмента в гелидиуме и определения оптимального весового соотношения элементов поликультуры в ёмкостях содержали разное количество мидий (3; 4; 5 особей с суммарным начальным весом 33,4; 41,4; 57 г) и кормили их взвесью *Tetraselmis viridis* в количестве 15; 25; 35 мл соответственно. Плотность культуры микроводоросли составляла 17 мг сырой массы на 1 мл и поддерживалась постоянной на протяжении всего эксперимента. В двух контрольных рабочих объёмах (№ 1 и 5) гелидиум культивировали на упомянутой выше среде [2] без добавления метаболитов, насыщая её только минералами и биогенами. Концентрацию R-фикоэритрина определяли после двух, трёх и четырёх недель культивирования.

Особенность третьего эксперимента заключалась в том, что гелидиум культивировали в пяти объёмах (№ 1–5) при равных исходных массах 2 г. В трёх из них (№ 2–4) количество поступающих метаболитов последовательно возрастало как за счёт разного числа особей мидий (3; 4; 5) из объёмов № 6–8, так и за счёт увеличения их рациона (5; 6,25; 7 мл культуры на особь).

Результаты первых двух экспериментов представлены в табл. 1 и 2, третьего — в табл. 3 и на рис. 1.

Таблица 1. Содержание R-фикоэритрина в гелидиуме, выращенном на экзометаболитах черноморских мидий с разными рационами питания микроводорослью

Table 1. R-phycoerythrin concentration in *Gelidium* grown on exometabolites of Black Sea mussels with different microalga diet

№ опыта	Объём культуры <i>Tetraselmis viridis</i> плотностью 12 мг сырого веса на 1 мл	Концентрация R-фикоэритрина, мг·г ⁻¹
Контроль	0	5,8 ± 0,5
1	10	6,4 ± 0,9
2	15	5,6 ± 0,4
3	20	7,9 ± 0,8

Из табл. 1 видно, что в поликультуре микроводоросль *Tetraselmis viridis* — мидия *Mytilus galloprovincialis* — макрофит *Gelidium spinosum* при кормлении экзометаболитами мидий концентрация R-фикоэритрина в гелидиуме возрастала в диапазоне 10–35 % (если результат опыта № 2 посчитать артефактом). Последняя цифра близка к результатам, полученным в эксперименте с анадарой [4].

Таблица 2. Содержание R-фикоэритрина в гелидиуме, выращенном на экзометаболитах мидий с добавлением в питательную среду биогенов и минеральных солей

Table 2. R-phycoerythrin concentration in *Gelidium* grown on mussel exometabolites with the addition of nutrients and mineral salts into the culture medium

№ опыта	Объём культуры <i>Tetraselmis viridis</i> плотностью 12 мг сырого веса на 1 мл	Концентрация R-фикоэритрина, мг·г ⁻¹
Контроль	0	7,9 ± 0,8
1	5	16,1 ± 1,5
2	10	20,3 ± 4,4
3	15	18,3 ± 2,2
4	20	28,8 ± 4,5

В табл. 2 представлены результаты эксперимента, в котором в рабочие объёмы с гелидиумом из объёмов с мидиями полностью сливали деконтат и обогащали его набором биогенов и микро-элементов. Испытаны четыре варианта рациона кормления мидий; максимальный (20 мл на объём) способствовал возрастанию концентрации R-фикоэритрина в гелидиуме более чем в три раза.

Результаты динамики весового роста и концентрации пигмента в третьем эксперименте представлены в табл. 3, а накопления R-фикоэритрина — на рис. 1.

Таблица 3. Динамика весового роста и концентрации R-фикоэритрина в талломах гелидиума при разном количестве особей мидий в поликультуре

Table 3. Dynamics of weight growth and R-phycoerythrin concentration in *Gelidium* thalli at different number of mussels in the polyculture

№ объёма	Кол-во мидий	V _{мв} , мл	Вес гелидиума, г / Содержание R-фикоэритрина, мг·г ⁻¹			
			30.01.2019	11.02.2019*	18.02.2019*	25.02.2019*
1; 5	0	0	2,0 / 6,9 ± 2,3	2,90 / 8,0 ± 2,3	3,00 / 9,6 ± 1,6	3,20 / 11,1 ± 1,2
2	3	15	2,0 / 6,9 ± 2,3	3,00 / 11,4 ± 2,4	2,55 / 8,7 ± 0,9	3,00 / 12,3 ± 1,2
3	4	25	2,0 / 6,9 ± 2,3	3,25 / 12,4 ± 1,8	3,10 / 10,6 ± 0,8	3,22 / 13,6 ± 0,9
4	5	35	2,0 / 6,9 ± 2,3	3,05 / 14,4 ± 1,4	2,85 / 14,9 ± 1,7	3,30 / 14,4 ± 0,1

Примечания: в отмеченные астериском (*) даты отбирали пробы на измерение R-фикоэритрина и возвращали вес гелидиума к W₀ = 2 г; V_{мв} — объём суспензии микроводоросли.

Note: at the dates marked with an asterisk (*), samples were taken to measure R-phycoerythrin, and *Gelidium* weight was returned to W₀ = 2 g; V_{мв} indicates volume of microalga suspension.

Результаты 4-недельного эксперимента показывают, что на 12-й день культивирования в вариантах с добавлением метаболитов из объёмов с 3, 4 и 5 мидиями накопление R-фикоэритрина превышает исходную контрольную величину на 50–100 %, а в ёмкостях без добавления метаболитов (объёмы № 1 и 5) — лишь на 16 %.

В конце третьей недели культивирования налицо значительное снижение концентрации пигмента в гелидиуме из объёма № 2, в который сливали деконтат из объёма с 3 мидиями. Это на 24 % ниже предыдущего результата и на 29 % — конечного. Поскольку минералами и биогенами водоросли во всех объёмах были снабжены одинаково, причиной могло стать изменение физиологического состояния как минимум одной из трёх особей мидий, которое мы в своих экспериментах не отслеживали.

Данный результат можно считать артефактом, так как в этом объёме ничего, отличающего его от остальных, обнаружено не было. В других наших экспериментах случались выбросы половых продуктов мидий (такие варианты могут быть предлогом для отдельных исследований их влияния на содержание R-фикоэритрина в гелидиуме).

По результатам четырёх недель культивирования отмечено следующее: уровни содержания пигмента в гелидиуме из рабочих объёмов № 2–4 выстроились по возрастающей прямо пропорционально предполагаемому увеличению количества экзометаболитов от 3, 4 и 5 мидий. Если уровень фикоэритрина в гелидиуме, культивируемом по уже известной методике [3] в объёмах № 1 и 5, принять за 100 %, можно заключить, что прибавки от использования экзометаболитов мидий составили 11, 12 и 30 % соответственно.

Максимальное содержание R-фикоэритрина, полученное во втором эксперименте (табл. 2), было вдвое выше, чем максимальное значение концентрации пигмента в третьем эксперименте (табл. 3). Это объясняется тем, что в последнем случае мы взяли водоросли на измерения непосредственно после окончания эксперимента и не использовали приём «дозревания», при котором в темноте и при пониженной температуре ликвидируется отставание накопления R-фикоэритрина в быстро растущей биомассе [3]. В данном случае удельная скорость весового роста биомассы была довольно высокой: биомасса удваивалась менее чем за 10 суток.

Изменение концентрации R-фикоэритрина в гелидиуме при разном количестве особей мидий в поликультуре наглядно представлено на рис. 1. Уже через две недели культивирования при питании макрофита экзометаболитами пяти мидий наблюдали возрастание содержания R-фикоэритрина вдвое. После четырёх недель культивирования разница с контролем снижалась и составляла примерно 25 %. Экзометаболиты трёх и четырёх мидий также вызывали возрастание концентрации пигмента через две недели культивирования — на 30 и 40 %.

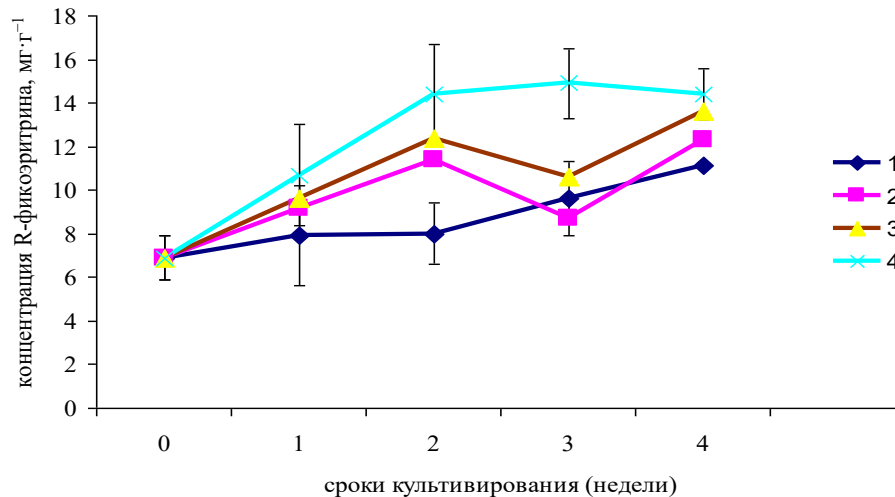


Рис. 1. Динамика концентрации R-фикоэритрина в гелидиуме при разном количестве особей мидий в поликультуре (1 — контроль; 2 — 3 мидии; 3 — 4 мидии; 4 — 5 мидий)

Fig. 1. Dynamics of R-phycoerythrin concentration in *Gelidium* with different number of mussels in the polyculture (1 – control; 2 – 3 mussels; 3 – 4 mussels; 4 – 5 mussels)

Средние результаты прироста гелидиума в объёмах № 2–4 за последние две недели третьего эксперимента — 1 г за неделю. Таким образом, система, включающая культиватор микроводоросли *Tetraselmis viridis* производительностью 600 мг сырого веса в сутки, 1,5-литровый объём для содержания пяти мидий общим весом 60 г и 1,5-литровый культиватор гелидиума, за семь суток вполне может выработать 14,4 мг R-фикоэритрина.

Из литературы известно о преимуществах культивирования макрофитов в поликультуре перед культивированием в монокультуре. Так, они накапливают бóльшую биомассу и большее количество белка [8 ; 14], а качество агара у грациллирии улучшается за счёт создания оптимального режима её питания в результате выделения экзометаболитов беспозвоночными [7].

Макроводоросли могут извлечь из воды до 60 % соединений азота, в том числе до 95 % аммония [14]. Мидии же, как известно, выделяют в среду аммонийный азот [5]. Хромофорная группа пигмента (фикобилин) ковалентно связана с водорастворимым белком типа глобулина [13], на построение которого необходим азот. Кроме того, фикобилипротеины принято считать «депо» белка в клетках водорослей. Они разрушаются в первую очередь при азотном голодании [6 ; 11]. Между тем вполне возможно, что на уровень содержания R-фикоэритрина влияет не только при-внесение азота, но и форма его соединения, однако, согласно предыдущим исследованиям, среда для культивирования содержала достаточное количество азота [3]. Вероятно, в данном случае влияют другие взаимодействия (например, на уровне гормональной регуляции). Таким образом, использование метаболитов, в том числе в поликультуре, создаёт принципиально новый путь регуляции природных процессов [8].

Закключение. Выявлено положительное влияние экзометаболитов мидии на синтез R-фикоэритрина в поликультуре микроводоросль *Tetraselmis viridis* — мидия *Mytilus galloprovincialis* — макрофит *Gelidium spinosum*. Внесение экзометаболитов моллюсков в чистую профильтрованную

морскую воду обеспечивает повышение концентрации R-фикоэритрина в гелидиуме на 10–35 %, а добавление экзометаболитов в сочетании со стандартной питательной средой приводит к увеличению содержания R-фикоэритрина более чем в 2 раза. Ориентировочные весовые соотношения элементов поликультуры в 1,5-литровых рабочих объёмах, позволяющие достичь желаемого результата уже через 2 недели: 2 г гелидиума / 50–60 г двухлетних мидий / 0,4–0,6 г сырого веса микроводорослей.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса» (№ гос. регистрации АААА-А18-118021350003-6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Беляев Б. Н. Техническое обеспечение культивирования макрофитов // *Рыбное хозяйство Украины*. 2001. № 5. С. 21–24. [Belyaev B. N. Tekhnicheskoe obespechenie kul'tivirovaniya makrofitov. *Rybnoe khozyaistvo Ukrainy*, 2001, no. 5, pp. 21–24. (in Russ.)]
2. Беляев Б. Н., Береговая Н. М. Влияние состава культуральной среды на количество агара, пигментов и рост черноморского *Gelidium spinosum* // *Морской биологический журнал*. 2016. Т. 1, № 4. С. 3–11. [Belyaev B. N., Beregovaya N. M. The influence of culture medium on the quantity of agar, pigments, and growth of *Gelidium spinosum* from the Black Sea. *Morskoy biologicheskij zhurnal*, 2016, vol. 1, no. 4, pp. 3–11. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.21072/mbj.2016.01.4.01>
3. Беляев Б. Н., Береговая Н. М. Способ культивирования черноморской красной водоросли *Gelidium spinosum* (Grev.) Born. et Thur (Rhodophyta). Патент RU 2691579 С2 МК C12N 1/12 A01G 33/00. Заявлен ФГБУН ИМБИ им. А. О. Ковалевского 09.11.2017 № 2017139062. Опубликовано 14.06.2019. Бюл. № 14. [Belyaev B. N., Beregovaya N. M. *Sposob kul'tivirovaniya chernomorskoj krasnoi vodorosli Gelidium spinosum* (Grev.) Born. et Thur (Rhodophyta). Patent RU 2691579 С2 МК C12N 1/12 A01G 33/00. Zayavlen FGBUN IMBI im. A. O. Kovalevskogo 09.11.2017, no. 2017139062. Opublikovan 14.06.2019. Bul. no. 14. (in Russ.)]
4. Бородина А. В., Береговая Н. М., Беляев Б. Н. Влияние экзометаболитов моллюсков *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) на макрофиты *Gelidium* sp. // *Science, technology and life – 2014* : International scientific conference, Czech Republic, Karlovy Vary, 27–28 Dec., 2014. [Karlovy Vary], 2014. С. 66–71. [Borodina A. V., Belyaev B. N., Beregovaya N. M. Vliyanie ekzometabolitov mollyuskov *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) na makrofity *Gelidium* sp. *Science, technology and life – 2014* : International scientific conference, Czech Republic, Karlovy Vary, 27–28 Dec., 2014. [Karlovy Vary], 2014, pp. 66–71. (in Russ.)]
5. Вялова О. Ю. Особенности энергетического и азотистого метаболизма неполовозрелых мидий *Mytilus galloprovincialis* Lam. в условиях эксперимента : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.17 / НАН Украины, Ин-т биологии южных морей им. А. О. Ковалевского. Севастополь, 2000. 17 с. [Vyalova O. Yu. *Osobennosti energeticheskogo i azotistogo metabolizma nepolovozrelykh midii Mytilus galloprovincialis* Lam. v usloviyakh eksperimenta : avtoref. dis. ... kand. biol. nauk : 03.00.17 / NAN Ukrainy, In-t biologii yuzhnykh morei im. A. O. Kovalevskogo. Sevastopol, 2000, 17 p. (in Russ.)]
6. Гудвилевич И. Н. Влияние условий культивирования на рост и содержание фикобилипротеинов красной микроводоросли *Porphyridium purpureum* (обзор) // *Экология моря*. 2010. Вып. 81. С. 28–36. [Gudvilovich I. N. The influence of cultivation conditions on growth and the phycobiliprotein content in the red microalgae *Porphyridium purpureum*. *Ekologiya morya*, 2010, iss. 81, pp. 28–36. (in Russ.)]
7. Евдокимов В. В. Морфофункциональная оценка гамет и продукционные возможности гидробионтов при размножении их в моно- и поликультуре : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.11 ; 03.00.08 / Тихоокеанский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии. Владивосток, 1991. 39 с. [Evdokimov V. V. *Morfofunktsional'naya otsenka gamet i produktsionnye vozmozhnosti gidrobiontov pri razmnozhenii ih v mono- i polikulturye* : avtoref. dis. ... d-ra biol. nauk : 03.00.11 ; 03.00.08 / Tikhookeanskiy nauchno-issledovatel'skiy institut rybnogo khozyaistva i okeanografi. Vladivostok, 1991. 39 s. (in Russ.)]

- pri razmnozhenii ikh v mono- i polikul'ture* : avtoref. dis. ... d-ra biol. nauk : 03.00.11 ; 03.00.08 / Tikhookeanskii nauchno-issledovatel'skii institut rybnogo khozyaistva i okeanografii. Vladivostok, 1991, 39 p. (in Russ.)]
8. Евдокимов В. В., Евдокимов А. В. Взаимодействие гидробионтов в поликультуре при воспроизводстве в контролируемых условиях // *Известия ТИНРО*. 2002. Т. 131. С. 373–380. [Evdokimov V. V., Evdokimov A. V. Vzaimodeistvie gidrobiontov v polikul'ture pri vosproizvodstve v kontroliruemymkh usloviyakh. *Izvestiya TINRO*, 2002, vol. 131, pp. 373–380. (in Russ.)]
 9. Калугина А. А., Грюнер В. С., Соколова Н. Н. Агар из черноморской водоросли гелидиум // *Рыбное хозяйство*. 1964. № 4. С. 68–70. [Kalugina A. A., Gryuner V. S., Sokolova N. N. Agar iz chernomorskoj vodorosli gelidium. *Rybnoe khozyaistvo*, 1964, no. 4, pp. 68–70. (in Russ.)]
 10. Красновский А. А. Выделение фикоэритрина из красных водорослей, его спектральные и фотохимические свойства // *Доклады Академии наук СССР*. 1952. Т. 82, № 6. С. 947–950. [Krasnovskii A. A. Vydelenie fikoeritrina iz krasnykh vodoroslei, ego spektral'nye i fotokhimicheskie svoistva. *Doklady Akademii nauk SSSR*, 1952, vol. 82, no. 6, pp. 947–950. (in Russ.)]
 11. Лось С. И. Влияние мочевины на спектральные свойства фикобилиновых пигментов водорослей // *Альгология*. 2009. Т. 19, № 1. С. 25–33. [Los' S. I. Influence of urea on spectral properties of phycobilin pigments of algae. *Al'gologiya*, 2009, vol. 19, no. 1, pp. 25–33. (in Russ.)]
 12. Минюк Г. С., Дробецкая И. В., Чубчикова И. Н., Терентьева Н. В. Одноклеточные водоросли как возобновляемый биологический ресурс: обзор // *Морской экологический журнал*. 2008. Т. 7, № 2. С. 5–23. [Minyuk G. S., Drobetskaya I. V., Chubchikova I. N., Terent'eva N. V. Unicellular algae as renewable biological resource: A review. *Morskoj ekologicheskij zhurnal*, 2008, vol. 7, iss. 2, pp. 5–23. (in Russ.)]
 13. Стадничук И. Н. *Фикобилпротеины*. Москва : ВИНТИ, 1990. 193 с. (Итоги науки и техники, сер. биологическая химия ; т. 40). [Stadnichuk I. N. *Fikobiliproteiny*. Moscow : VINITI, 1990, 193 p. (Itogi nauki i tekhniki, ser. biologicheskaya khimiya ; vol. 40). (in Russ.)]
 14. Титлянов Э. А., Титлянова Т. В. *Морские растения стран азиатско-тихоокеанского региона, их использование и культивирование*. Владивосток : «Дальнаука». 2012. 362 с. [Titlyanov E. A., Titlyanova T. V. *Morskie rasteniya stran aziatsko-tikhookeanskogo regiona, ikh ispol'zovanie i kul'tivirovanie*. Vladivostok : "Dal'nauka", 2012, 362 p. (in Russ.)]

INFLUENCE OF MUSSEL *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* EXOMETABOLITES ON R-PHYCOERYTHRIN CONCENTRATION IN RED ALGA *GELIDIUM SPINOSUM* WHEN GROWN IN POLYCULTURE

B. N. Belyaev and N. M. Beregovaya¹

¹A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation
E-mail: belyaevbob@yandex.ru

To increase R-phycoerythrin concentration in red Black Sea alga *Gelidium spinosum* (S. G. Gmelin) P. C. Silva, 1996 (Rhodophyta), it was cultivated in laboratory conditions in polyculture microalga *Tetraselmis viridis* – mussel *Mytilus galloprovincialis* – *Gelidium*; the results of the study are presented. The positive effect of mussel exometabolites on R-phycoerythrin concentration in *Gelidium* in polyculture is described. The relevance of the work is determined by the value of R-phycoerythrin, which is used as a powerful antioxidant, as well as a marker in cytometry and microscopy. The aim of the study is to increase R-phycoerythrin concentration in *Gelidium* using the polyculture method. As a material, *Gelidium* from the fouling of rocks and coastal protection structures of Karantinnaya Bay (Sevastopol) was used; it was cultivated in a laboratory installation with eight working volumes, four of which contained mussels. Mussel decontamination, supplemented with mineral salts and biogens, was used as a nutrient medium for *Gelidium*. The combination of mussel exometabolites with previously developed nutrient medium, based on Black Sea water and enriched with nutrients and mineral salts, results in an increase in R-phycoerythrin concentration by more than 2 times, while the addition of exometabolites to pure filtered seawater increases it maximum by 35 %. Approximate ratios of polyculture elements in 1.5-L volumes, allowing to achieve the desired results in 2 weeks, are as follows: 2 g of *Gelidium* / 50–60 g of two-year-old mussels / 0.4–0.6 g of microalga wet weight.

Keywords: cultivation, polyculture, microalgae, molluscs, macrophytes, nutrient medium

UDC 574.587.015(268.45)

BARENTS SEA MEGABENTHOS: SPATIAL AND TEMPORAL DISTRIBUTION AND PRODUCTION

© 2020 D. V. Zakharov^{1,2}, L. L. Jørgensen³, I. E. Manushin¹, and N. A. Strelkova¹

¹Polar branch of VNIRO (“PINRO” named after N. M. Knipovich), Murmansk, Russian Federation

²Murmansk Marine Biological Institute RAS, Murmansk, Russian Federation

³Institute of Marine Research, Tromsø, Norway

E-mail: zakharden@yandex.ru

Received by the Editor 11.10.2019; after revision 07.05.2020;
accepted for publication 26.06.2020; published online 30.06.2020.

This long-term observation of the faunal composition within the Barents Sea provides a benchmark for monitoring community changes caused by oceanographic variability, fishery activities, and crab predators (*Chionoecetes opilio*, *Paralithodes camtschaticus*), whose populations have been rapidly growing and spreading in recent years. In the Arctic systems, megabenthic communities comprise a significant part of benthic biomass and play an important role in carbon cycling on continental shelves. The gradual accumulation of knowledge on megabenthos may make it possible to assess their role in the ecosystem and ultimately contribute to a more rational management of the Barents Sea resources. This article represents an important series of long-term megabenthic observations in the Barents Sea. The main goal of our research is to identify spatial patterns and temporal trends in the megabenthic part of communities, including changes in the biomass and production values. As a part of the joint Norwegian-Russian ecosystem surveys, benthic experts have been identifying the invertebrates (megafauna) collected by bottom trawls during annual assessments of commercial stocks, such as Atlantic cod (*Gadus morhua*) and northern shrimp (*Pandalus borealis*). The sampling equipment used was a Campelen 1800 bottom trawl, rigged with rockhopper ground gear and towed on double warps, and standardized to a fixed sampling effort (equivalent to a towing distance of 0.75 nautical miles (nm), or 1.4 km). The processing of the biological material was conducted in accordance with standardized procedures, following the retrieval of each trawl. This work represents data from 5016 stations from 2005 to 2017, with a total sampled biomass of 238.4 tons and 14.9 million individual organisms. In total, 694 megabenthic species (1058 taxa) have been recorded, with the greatest diversity observed in the depth range of 100–400 m, while the largest mean catches were taken between depths of 600–800 m. The biomass (B) and production (P) values of the benthic megafauna were approximately stable during the 9 years of investigation, although there was a decreasing trend after 2014. The annual production P/B ratio of megabenthos was calculated to be at 0.3. The distribution, contribution to production, and gross biomass values of the megabenthos had been underestimated in the previous studies of zoobenthos. The results from this research show that, in the current warm period, the majority of the Barents Sea is in an intermediate state between the Arctic and boreal regions due to the wide distribution of boreal species toward the north. The dynamics of the mean biogeographical index (the border between areas of the dominance of boreal and Arctic species) within the central-southern part of the Barents Sea suggests that a large part of the area can be characterized as predominantly boreal intermediate since 2013.

Keywords: Arctic, Barents Sea, megabenthos, climate, Atlantic Current, production, species distribution

The effects of global climate change have been particularly noticeable in the Arctic, causing a restructuring of Arctic ecosystem [19 ; 25 ; 33] and a northward shift of biogeographical boundaries as a consequence of warming [5 ; 6 ; 10 ; 12 ; 18 ; 21].

In the Arctic systems, megabenthic communities comprise a significant part of benthic biomass [7 ; 30] and play an important role in carbon cycling on continental shelves [23 ; 32]. Marine benthic communities are well-suited for long-term comparative investigations, as comprising species have a relatively long lifespan and either are sessile or have low motility. These traits make it possible to measure the effects of environmental change on communities over time. The potential impact of climate change on the marine environment may be acute, but it is difficult to register due to the lack of baseline data. A recent analysis showed that 34–59 % of Arctic megafauna taxa have yet to be documented [45].

The Barents Sea is a continental shelf sea with an average depth of 230 m (Fig. 1a); it is characterized by a transitional zone from warm Atlantic waters to cold Arctic ones (Fig. 1b) [43 ; 44]. Substantial climatic changes have been observed during the last four decades [8 ; 47]. Water temperatures in the subarctic Barents Sea during the past decade have reached the highest rates over the period observed [8]. Ice coverage has declined by about 10 % [4], while water temperature has risen by approximately 1.5 °C [35]. The area covered by the warmer Atlantic water has increased [28] due to northward shifts in the polar front, where Atlantic and Arctic water masses meet [43].

Analysis of Barents Sea benthic megafauna shows clear biogeographical patterns, with an Arctic productive community dominating in the northeast [11] and occasionally in the northwest, and an Atlantic warm water community in the southwest [29 ; 30]. A deep-cold-water community is found in the northwestern part of the Barents Sea shelf. A shallow bank community is predominant on the Spitsbergen Bank located southwards of Spitsbergen and in the southeastern Barents Sea. This shallow bank community is also found sporadically west and north of Spitsbergen [30].

It has been suggested that climate change is causing a northward shift of biogeographical boundaries in the northern hemisphere due to the warming process [21]. The number of boreal species has increased, while the number of arctic species have declined [31]. The range of some species has expanded, and new boreal-subtropical species have appeared in the Arctic [52 ; 53].

The gradual accumulation of knowledge on megabenthos may make it possible to assess its role in the ecosystem and ultimately contribute to a more rational management of Barents Sea resources. This article presents an important series of long-term megabenthic observations in the Barents Sea. The main goal of our research is to identify spatial patterns and temporal trends in the megabenthic part of communities, including changes in biomass and production values.

MATERIAL AND METHODS

Benthos sampling. Norwegian and Russian ships were used to survey the Barents Sea annually August to November. Sampling stations were established at fixed positions along a regular grid (around 35 nautical miles between each station), covering an area of about 1.5 million km². The sampling equipment used was a Campelen 1800 bottom trawl, rigged with rockhopper ground gear, towed on double warps, and standardized to a fixed sampling effort (equivalent to a towing distance of 0.75 nautical miles, or 1.4 km). The horizontal opening was 15 m, and the vertical one was 5 m. The mesh size was 80 mm (stretched) in the front and 22 mm in the cod end, allowing capture and retention of vertebrates (fishes) and large invertebrates (megabenthos) from the seabed. All catch data presented in the article have been standardized to 1 nautical mile (hereinafter nm).

Data. Benthos specialists from the Polar branch of VNIRO (Russian and Norwegian ships), Institute of Marine Research, Murmansk Marine Biological Institute, and other international institutions (Norwegian ships) were involved in the processing and identification of benthos collected by the scientific trawl during the annual Norwegian-Russian Ecosystem Survey [1].

The processing of the biological material was conducted in accordance with standardized procedures, following the retrieval of each trawl [30]. The invertebrates were separated from the vertebrate catch in the onboard fish laboratory. Depending on catch weight, the material was processed in total or as a subsample. Records were made using paper datasheets, to be entered into a database afterward.

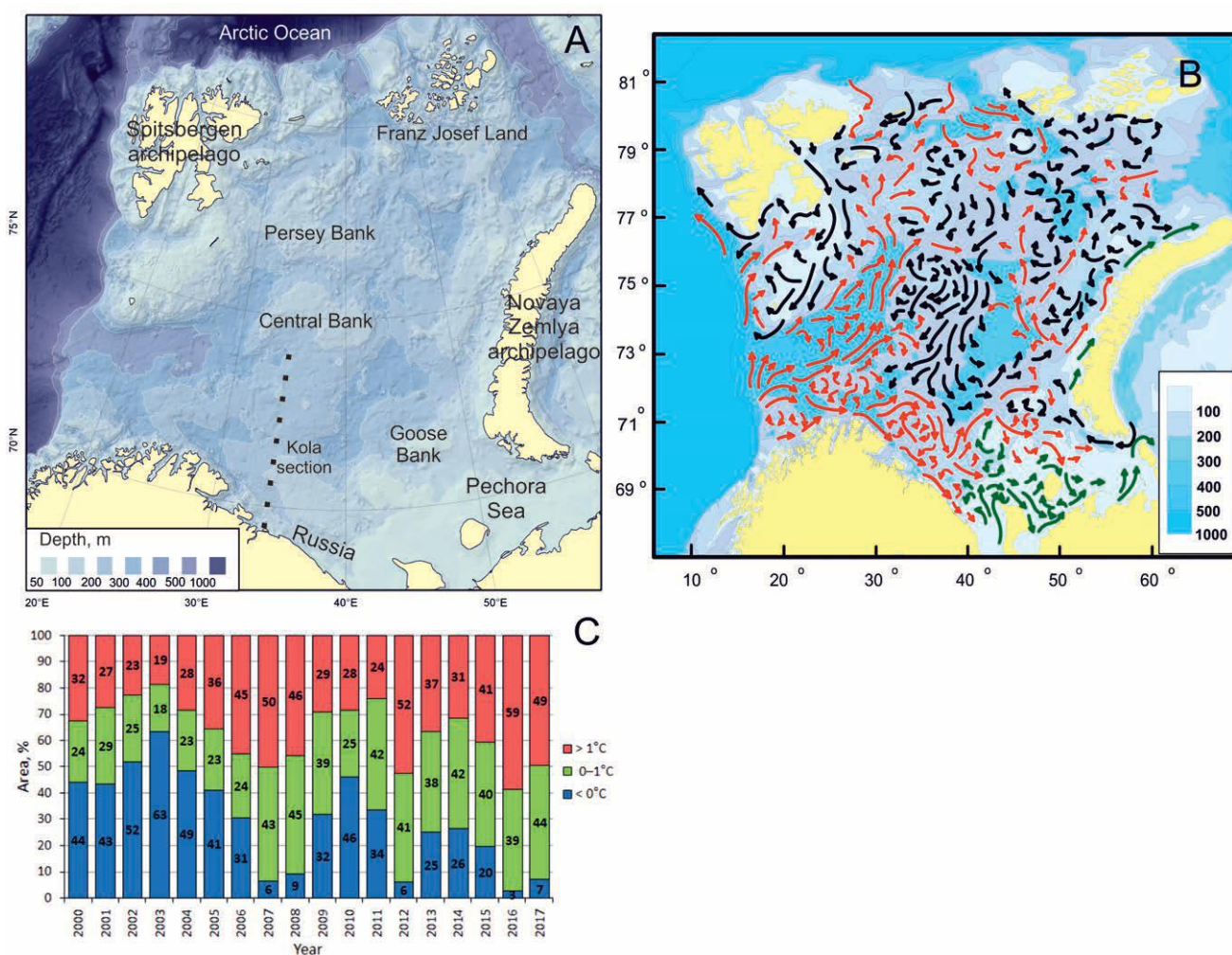


Fig. 1. The Barents Sea, with: A – a map showing place names and depth contours; B – a map of bottom water currents with arrows showing: 1) the main streams of Atlantic water (red), 2) coastal currents (green), and 3) cold Arctic currents (black) [49]. C – % of areas covered by water with different bottom temperatures in the Barents Sea (N71–79°, E25–55°) (August to September in 2000–2017) [26]

Рис. 1. Баренцево море: А — карта с указанием топографических названий и глубин; В — карта придонных течений, красные стрелки показывают основные потоки Атлантического течения, зелёные — прибрежные течения, чёрные — холодные арктические течения [49]. С — соотношение площади дна с различной придонной температурой воды в Баренцевом море (71–79° с. ш., 25–55° в. д.) в августе — сентябре 2000–2017 гг. [26]

The total subsample weight was used to determine the adjustment factor in order to represent the full catch. All large (> 100 g) species, as well as rare megabenthic ones, were taken from the total catch, while the remaining species were extracted only from the subsample.

Most of the taxonomic processing was undertaken onboard to the lowest possible taxon. In cases of identification difficulties, the species were photographed and/or preserved for further processing by taxonomic specialists on land. In order to develop standardized species identification across all involved ships and throughout the entire research period, the naming of all the species was checked using photographs of each processed catch since 2013.

Following identification, the number of individuals of each species or taxon was counted, and wet weight was measured on electronic balances (± 0.5 g).

Totally, 5016 stations were sampled between 2005 and 2017 (Fig. 2). The total sampled biomass of benthic megafauna was 238.4 tons, consisting of over 14.9 million individuals. Some individuals were assigned to the genus or higher taxonomic level due to difficulties with their species identification. The final

list included 1058 taxa, of which 694 were identified to species onboard (Table 1). As the Campelen trawl is designed to catch northern shrimp (*Pandalidae* family), this semipelagic shrimp could be overestimated in the data, and therefore it was excluded from the analysis and used only for megabenthic data smoothing. Similarly, all pelagic species, such as jellies (Scyphozoa), were also excluded from the analysis. Values are presented as mean \pm standard error (hereinafter *SE*) unless otherwise stated.

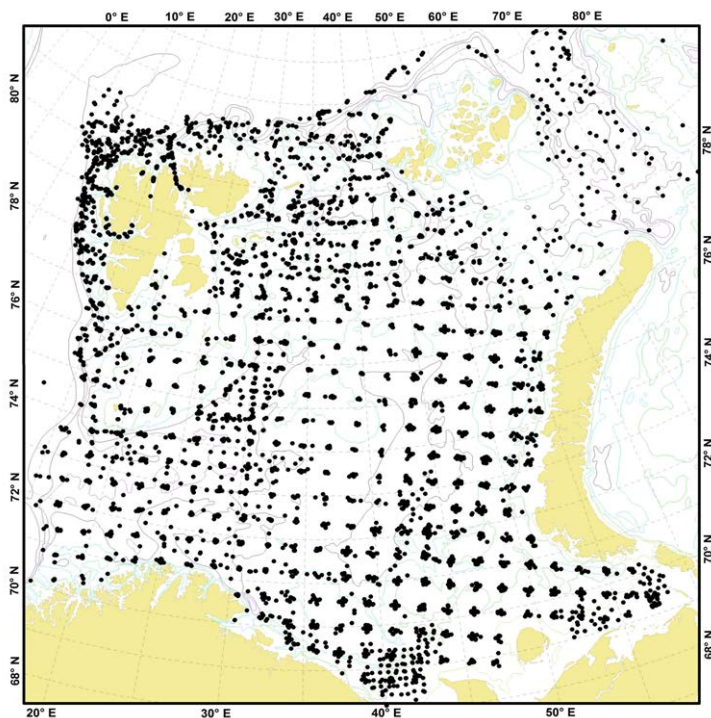


Fig. 2. Location of 5016 trawl stations covered during 2005–2017 by the joint Norwegian-Russian Ecosystem Survey

Рис. 2. Положение 5016 донных траловых станций, выполненных в ходе проведения норвежско-российских экосистемных съёмок в 2005–2017 гг.

Table 1. Summary of the analyzed megafauna from the joint Norwegian-Russian Ecosystem Survey (2005–2017)

Таблица 1. Объём материала, проанализированного в экосистемных съёмках 2005–2017 гг., и его основные характеристики

Year	Number of stations	Total		Average abundance (ind.·nm ⁻¹)	Average biomass (kg·nm ⁻¹)	Amount	
		Abundance (ind.)	Biomass (tons)			species	taxa
2005	224	107,114.0	2.6	522.5	12.7	142	218
2006	637	964,569.0	25.9	1576.0	42.1	261	388
2007	551	633,761.5	22.9	1240.2	44.6	222	351
2008	431	901,885.1	14.8	2183.7	35.7	157	244
2009	378	769,129.3	15.9	2056.4	42.2	283	391
2010	319	285,322.8	8.6	900.0	27.3	273	360
2011	391	1,333,887.2	13.4	3411.4	34.3	282	442
2012	443	4,345,807.4	55.6	9832.1	125.5	354	513
2013	487	1,888,138.0	34.8	3885.0	71.7	362	538
2014	165	463,108.6	6.0	2806.7	36.7	220	333
2015	334	606,272.4	6.6	1815.1	19.9	398	599
2016	317	1,340,958.8	11.5	4230.1	36.3	266	423
2017	339	1,277,828.3	19.8	3769.4	58.6	319	500
Total	5016	14,917,782.4	238.4	2940.7*	45.2*	694	1058

Note: * indicates the mean value across all years.

Примечание: * — среднее значение за все годы.

To determine whether there were any temporal differences in abundance and smoothed mean biomass among megabenthic fauna across the Barents Sea, the mean values per grid cell (N0.5°, E2°) were calculated both for early (2005–2011) and late (2012–2017) time periods of the study (see Figs 8 and 9).

Data smoothing. An examination of megabenthic biomass values in the Barents Sea indicated extensive inter-annual variations (Table 1). Therefore, the following steps were taken to minimize the chances of a possible sampling error and a distortion of results: 1) data collection was restricted to the area between N68–80°, E15–62° in order to exclude sectors covered only occasionally; 2) catches of > 1 ton were excluded; 3) shrimps of the Pandalidae family were excluded from the overall calculations and analyzed separately because all species of this family are benthopelagic, and the Campelen trawl possesses high catchability for such shrimps [51].

A smoothing function was constructed using a second-degree polynomial equation that was considered to minimize fluctuations in megafauna data. This was done for both Russian and Norwegian data samples, followed by a merge into a consolidated database. The smoothing procedure was conducted in three steps: 1) smoothing Pandalid data; 2) smoothing sessile epifauna data; 3) smoothing data of two other ecological groups (mobile epifauna and infauna).

The smoothing of Pandalid shrimp annual biomass data showed that the majority of shrimp biomass values had insignificant variations when compared to the smoothing curve. From the adjusted Pandalid values, correction coefficients were used to adjust the sampled biomass data of other taxa.

After this process, the megabenthic biomass was divided into three categories: “sessile epifauna”, “mobile epifauna”, and “infauna”. Because epifauna biomass fluctuated more than biomass of Pandalid shrimps, a second correction coefficient derived from the second-degree polynomial equation was calculated in the same way as for Pandalid shrimp biomass.

For mobile epifauna and infauna, the real values were divided by the second correction coefficient. Thereafter, modified biomass values of the mobile epifauna and infauna were smoothed in the same way. Smoothed data were used for further analysis in special cases, which are discussed below.

Production was calculated by multiplying taxon biomass by production to biomass (P/B) ratio. Two types of P/B ratio were used. The first was calculated for the major taxonomic groups from Degen *et al.* [11], and the second was calculated from the Manushin formula [37] (Table 2), except for taxa Porifera, Cnidaria, and Bryozoa, that were taken from Degen *et al.* [11]. Community production was calculated from the summarized production value of each taxon/species per station.

Table 2. Equations describing the dependence of the P/B ratio on mean body weight (\bar{W} , g of wet weight) for different taxa

Таблица 2. Уравнения, описывающие зависимость коэффициента P/B от средней массы тела (\bar{W} , г сырой массы) для разных таксонов

Taxon	Equation
Annelida	$P / B = 0.365 \times \bar{W}^{-0.377}$
Arthropoda	$P / B = 2.190 \times \bar{W}^{-0.276}$
Chordata	$P / B = 0.073 \times \bar{W}^{-0.579}$
Echinodermata	$P / B = 0.730 \times \bar{W}^{-0.342}$
Total	$P / B = 0.694 \times \bar{W}^{-0.390}$

Biogeographical analysis. The biogeographical status of the Barents Sea can be assessed by determining the boundary lines between the Arctic and boreal communities at different points in time. The fluctuation of these boundary lines over time reflects the effects that water temperature changes have on benthic fauna. Here the Biogeographical Indices (hereinafter BGI) [38] are used to show the ratio between the boreal and Arctic components of the fauna:

$$BGI = \frac{Bb - Ba}{Bb + Ba}, \quad (1)$$

where Bb and Ba are biomasses of the boreal and Arctic species, respectively.

Each species from the stations was placed into one of three biogeographical categories: “boreal”, “Arctic”, or “boreal-Arctic” [50]. Afterwards, all species classified as “boreal-Arctic” were excluded from further analyses, leaving only pure “boreal” and “Arctic” species to be used in the calculation of the boreal-Arctic ratio per station [46]. The station value of the BGI varied from -1 (only Arctic species) to $+1$ (only boreal species). In the case of absence or equal amounts of boreal and Arctic species, the BGI for a station is zero. The stations with such BGI values represent the hypothetical boundary line between the Atlantic boreal and Arctic biogeographical regions.

To illustrate the BGI distribution, the Barents Sea and adjacent waters were divided into grid cells (10° long., 1° lat.), and the mean values of all stations per grid cell over a 3-year period were calculated and used as input for the map.

To show the distributional dynamics of borderlines between areas dominated by either boreal or Arctic species (*i. e.*, $BGI = 0$) 2005 to 2017, the centroid of each grid cell was used to plot the BGI in Map Viewer (Golden Software) [20]. The inverse distance to a power method was performed for gridding, and the moving average method was used for calculating the time series. Henceforth, the name “**boreal-Arctic boundary**” is used for the hypothetical boundary lines ($BGI = 0$) between the Atlantic boreal and Arctic biogeographical regions.

Dynamics of boundary shifts in the region of $N69-76^\circ$, $E20-55^\circ$ 2005 to 2017 was described using the BGI per cell over a 3-year period and calculated using the moving average method. The area delimited by $N69-76^\circ$, $E20-55^\circ$ was chosen for the analysis because it provided the most informative annual station coverage during the research period, with the exceptions being 2005 and 2014 due to the lack of data from the Norwegian participants of the study.

RESULTS

Biomass dynamics. The mean biomass 2006 to 2017 was estimated to be $31 \text{ kg}\cdot\text{nm}^{-1}$. The mean biomass varied year to year, with the highest mean observed in 2012 ($54 \text{ kg}\cdot\text{nm}^{-1}$) and the lowest one registered in 2010 ($22 \text{ kg}\cdot\text{nm}^{-1}$) (Fig. 3A). The smoothed annual biomass reduced the maximum values of 2012 and 2017 considerably, resulting in a relatively stable curve, although variability increased after 2013, with the lowest biomass means observed in 2016 and 2017 (Fig. 3B). The average smoothed biomass 2006 to 2017 was estimated at $27 \text{ kg}\cdot\text{nm}^{-1}$, with annual means varying $-6 \text{ kg}\cdot\text{nm}^{-1}$ in 2016 to $+7 \text{ kg}\cdot\text{nm}^{-1}$ in 2014.

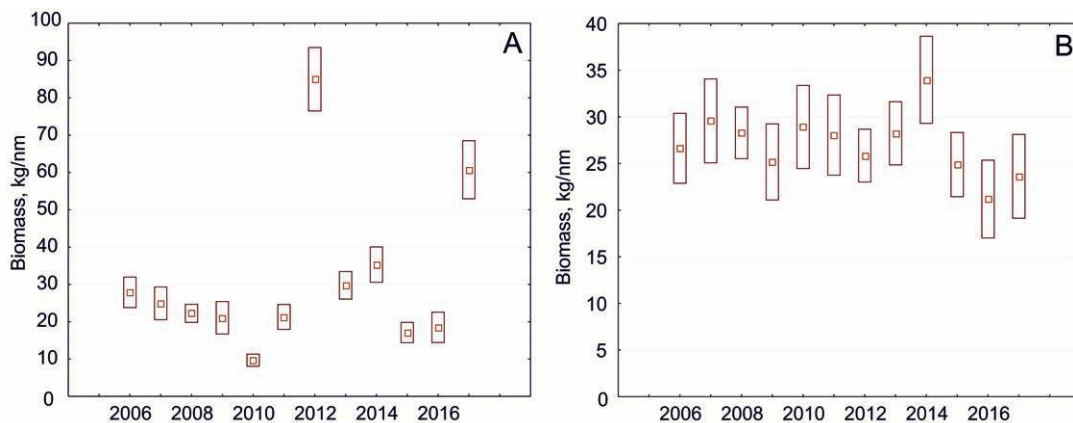


Fig. 3. Inter-annual variations in mean ($\pm SE$) biomass ($\text{kg}\cdot\text{nm}^{-1}$) in the Barents Sea for observed (A) and smoothed (B) data (2006–2017)

Рис. 3. Межгодовые изменения средней ($\pm SE$) биомассы (кг на морскую милю) в Баренцевом море для наблюдаемых (A) и сглаженных (B) данных (2006–2017)

Biomass of different taxa. The surveys in the Barents Sea have revealed patterns in the distribution of the megabenthic fauna. For the region as a whole, Porifera biomass dominated the fauna, followed by that of Arthropoda and Echinodermata (Fig. 4).

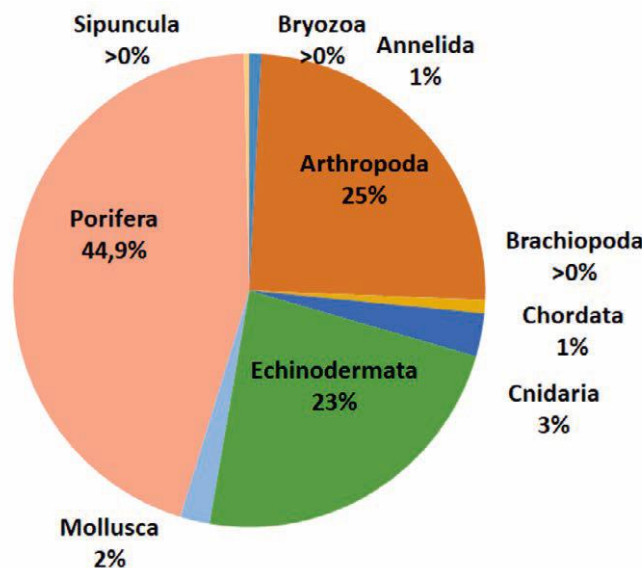


Fig. 4. Biomass distribution of the main megabenthic groups from 2005–2017 trawl surveys in the Barents Sea

Рис. 4. Соотношение биомассы основных групп мегабентоса в Баренцевом море по результатам траловых съёмки 2005–2017 гг.

Patterns were also noted in the spatial distribution in phyla biomass within the survey area (Fig. 5). Porifera was predominant in the western and northern peripheral areas; Arthropoda was predominant in the central and northwestern areas, while Echinodermata dominated mostly at the northern stations of the Barents Sea. Cnidaria dominated in the deep stations in the northern periphery but also had a noticeable presence in several locations in the central Barents Sea. Chordata (mainly Ascidiacea) biomass was dominant sporadically but with no apparent pattern. Areas with even phyla distribution were particularly prevalent in the shallow areas of the Novaya Zemlya Bank (eastern Barents Sea), Spitsbergen (northwestern Barents Sea) and other bank areas, due to the diversity of biotopes and environmental conditions there.

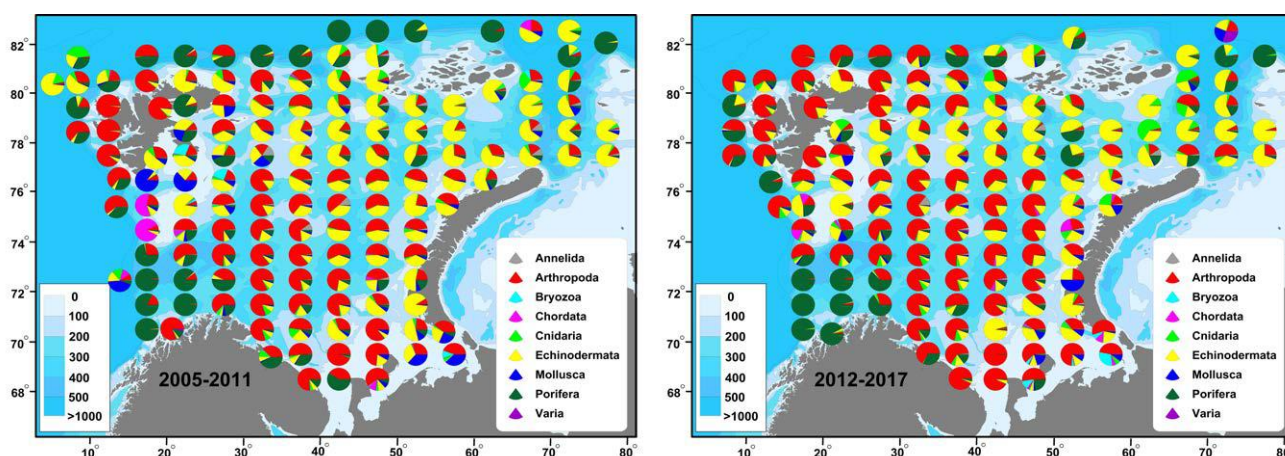


Fig. 5. Biomass distribution of the main phyla (Arthropoda, Echinodermata, Mollusca, and Porifera) and other groups (Annelida, Bryozoa, Sipuncula, Cnidaria, Chordata, and Brachiopoda) shown as mean values per grid cell (N1°, E5°) in 2005–2011 and 2012–2017

Рис. 5. Соотношение биомассы основных типов (Arthropoda, Echinodermata, Mollusca и Porifera) и других групп (Annelida, Bryozoa, Sipuncula, Cnidaria, Chordata и Brachiopoda) в генерализованном квадрате (N1°, E5°), данное в виде средних значений в 2005–2011 и 2012–2017 гг.

Several changes were observed in phyla dominance from the early period (2005–2011) to the late one (2012–2017). The northernmost stations, adjacent to the Arctic Ocean, shifted from being dominated by either Arthropoda or Echinodermata to becoming almost entirely dominated by Porifera. Along the west coast of Novaya Zemlya, the previously high diversity of phyla changed to domination by Arthropoda. Meanwhile, the central-eastern Barents Sea (N72–77°, E40–50°) has shifted from mostly Arthropoda to being dominated by Echinodermata.

Inter-annual variation in biomass (smoothed values) of five most dominant taxa revealed that Porifera remained relatively stable, except in 2017 when the biomass increased. The biomass of Cnidaria and Echinodermata experienced rapid decreases from 2015, while Arthropoda and Mollusca were more variable, ending with low values in 2017 (Fig. 6). Arthropoda and Echinodermata biomass were inversely related (linear regression is as follows: Echinoderm biomass = $-1.4 \times$ Arthropod biomass + 19.1; $R^2 = 0.64$).

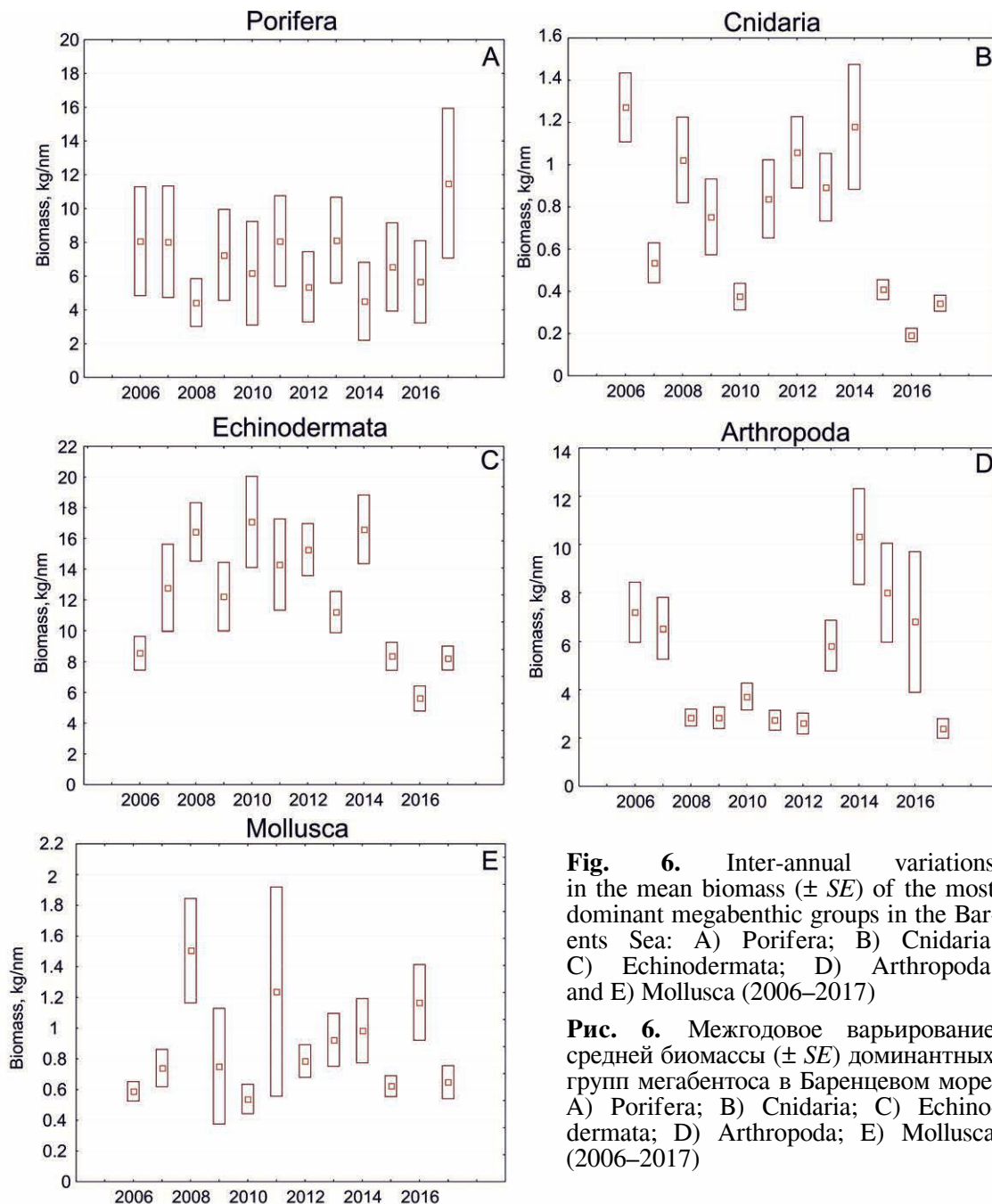


Fig. 6. Inter-annual variations in the mean biomass ($\pm SE$) of the most dominant megabenthic groups in the Barents Sea: A) Porifera; B) Cnidaria; C) Echinodermata; D) Arthropoda; and E) Mollusca (2006–2017)

Рис. 6. Межгодовое варьирование средней биомассы ($\pm SE$) доминантных групп мегабентоса в Баренцевом море: A) Porifera; B) Cnidaria; C) Echinodermata; D) Arthropoda; E) Mollusca (2006–2017)

The number of species. Species of the Barents Sea, presented as the mean number of species recorded during 2005–2017 (Fig. 7), had the highest values around Spitsbergen, while the lowest value was found in the northeastern region, which had the poorest coverage during the research period. However, low species diversity was also recorded in the southern areas of the Barents Sea that had experienced regular coverage as in the western and central areas of the sea.

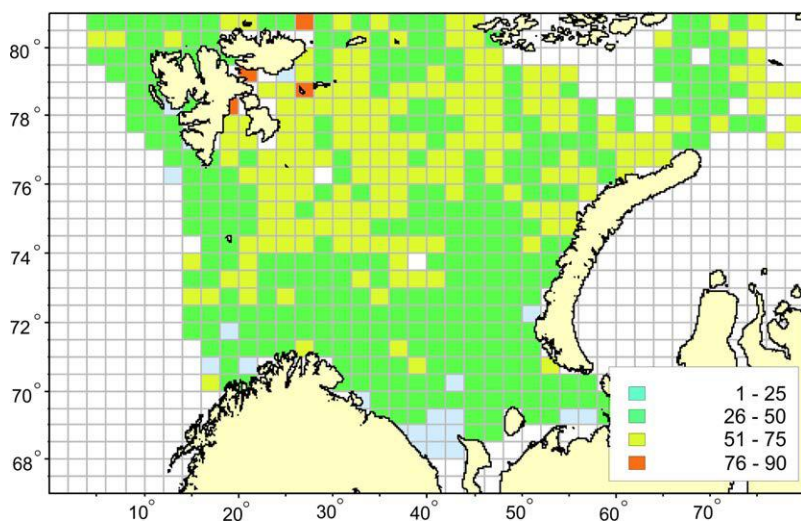


Fig. 7. Mean number of megabenthic species in the Barents Sea per grid cell ($N0.5^\circ$, $E2^\circ$) across the research period (2005–2017)

Рис. 7. Среднее количество видов мегабентоса в Баренцевом море в генерализованном квадрате ($N0.5^\circ$, $E2^\circ$) за период исследования (2005–2017)

Abundance and biomass distribution during two time periods (2005–2011 and 2012–2017). The mean abundance was generally similar for both periods (the early one – (5489 ± 226) ind. \cdot nm $^{-1}$; the late one – (5023 ± 363) ind. \cdot nm $^{-1}$). However, the maximum catch nearly doubled between the early and late periods: 388,000 to 793,000 ind. \cdot nm $^{-1}$. *F*-test shows that the differences between periods are statistically significant ($F_{fact} (0.38) < F_{crit} (0.93)$; p -value = 0.0).

For both the early and late periods (Fig. 8), high mean abundances (up to 50,000 ind. \cdot nm $^{-1}$) were recorded in the central region of the Barents Sea. However, in the late period, high abundances were also frequently noted in the northeastern region. The lowest abundances were observed in the southern area, particularly around Cape Kanin Nos that had regular coverage, but also in the northwest in the early period with poor coverage.

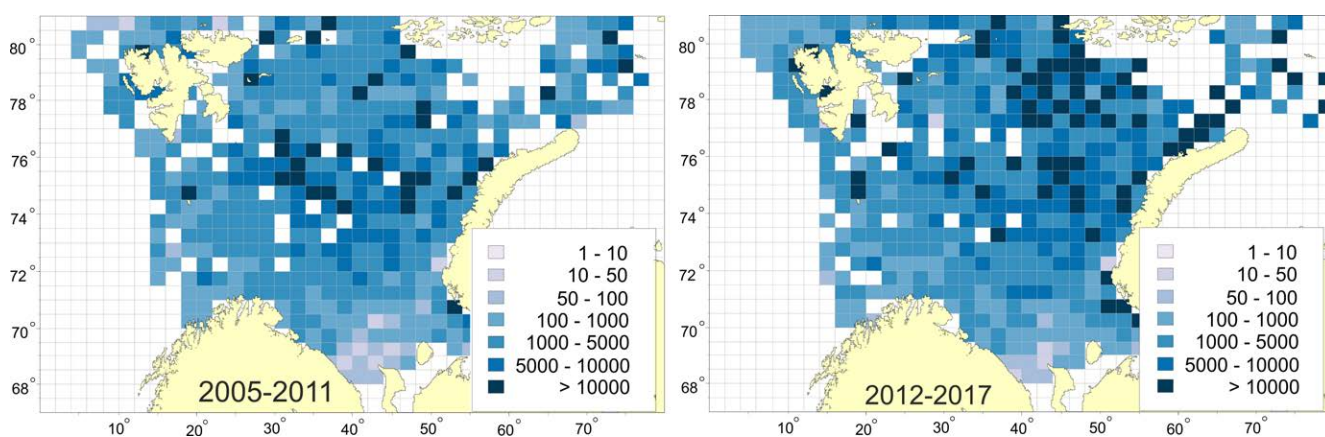


Fig. 8. Mean abundance (ind. \cdot nm $^{-1}$) per grid cell ($N0.5^\circ$, $E2^\circ$) for the early (2005–2011) and late (2012–2017) research periods

Рис. 8. Средняя численность (экз. на морскую милю) в генерализованном квадрате ($N0.5^\circ$, $E2^\circ$) для раннего (2005–2011) и позднего (2012–2017) периодов исследования

The smoothed mean biomass decreased both in the early and late periods: (70.6 ± 6.6) $\text{kg}\cdot\text{nm}^{-1}$ in the earlier period to (63.0 ± 6.2) $\text{kg}\cdot\text{nm}^{-1}$ in the later one (Fig 9). F -test showed that these differences were statistically significant ($F_{\text{fact}} (1.12) > F_{\text{crit}} (0.07)$; p -value = 0.0025). Meanwhile, the maximum catch increased $8.5 \text{ t}\cdot\text{nm}^{-1}$ in the early period to $9.8 \text{ t}\cdot\text{nm}^{-1}$ in the late one.

In the early period, the largest catches (> 1 ton) were obtained in the southwestern part of the Barents Sea (Fig. 9) due to the abundant sponge fields in this area; these were intentionally avoided in the late period due to the risk of damage to the bottom fauna and the gear. While relatively large catches have been made within a large area of the central Barents Sea in the early period, similar catches were mostly observed in the northeastern part of the Barents Sea during the late period. Late period data showed that large areas of the southeastern Barents Sea had the lowest biomass amounts ($< 1 \text{ kg}\cdot\text{nm}^{-1}$).

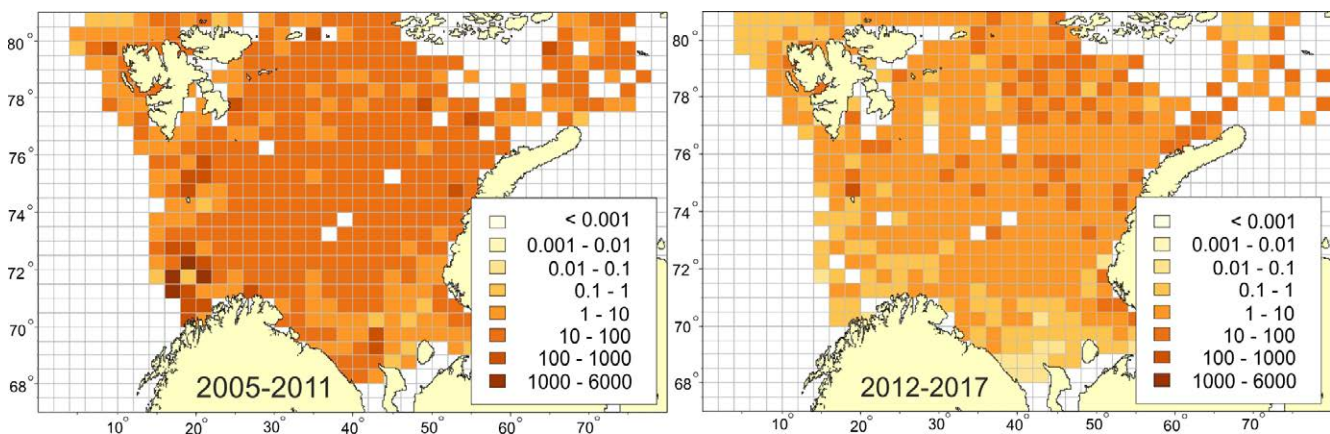


Fig. 9. Mean biomass ($\text{kg}\cdot\text{nm}^{-1}$, smoothed values) per grid cell ($\text{N}0.5^\circ$, $\text{E}2^\circ$) across 2005–2011 and 2012–2017

Рис. 9. Средняя биомасса (кг на морскую милю, сглаженные значения) в генерализованном квадрате ($\text{N}0.5^\circ$, $\text{E}2^\circ$) в 2005–2011 и 2012–2017 гг.

The depth-related species richness, abundance, and biomass are shown in Fig. 10A, and a sampling frequency – in Fig. 10E. The highest sampling frequency and, therefore, more robust results were observed at 100–400-m depth. Stations shallower than 50 m or deeper than 600 m were less frequently sampled. In terms of species richness, the greatest diversity was seen at depths of 100–400 m (642 species), with lower richness on stations at ≤ 50 m (179 species) and a steady decline in richness at 500 m and deeper (≤ 347 species). The largest biomasses (average catch $> 100 \text{ kg}\cdot\text{nm}^{-1}$) were caught at 700-m depth, while the lowest biomasses ($< 20 \text{ kg}\cdot\text{nm}^{-1}$) – at ≥ 900 m. The highest abundances were noted at 200–300-m depth (more than $5000 \text{ ind.}\cdot\text{nm}^{-1}$), while the lowest (less than $500 \text{ ind.}\cdot\text{nm}^{-1}$) took place at ≤ 50 m and ≥ 700 m.

Production. When comparing the results for calculating production (see Fig. 11), the inter-annual variation showed similar trends between two methods, but at different scales, with the Manushin values being almost twice as large as those obtained with using the Degen *et al.* method (Fig. 11). Inter-annual variations of average megabenthic production in the Barents Sea in 2006–2017 reached the highest in 2008 and 2014 and the lowest in 2017. Most years showed a range $3\text{--}4 \text{ kg}\cdot\text{nm}^{-1}\cdot\text{year}^{-1}$ (Fig. 11A) with a mean of (3.6 ± 0.6) $\text{kg}\cdot\text{nm}^{-1}\cdot\text{year}^{-1}$ or $7\text{--}10 \text{ kg}\cdot\text{nm}^{-1}\cdot\text{year}^{-1}$ with a mean of (8.1 ± 0.1) $\text{kg}\cdot\text{nm}^{-1}\cdot\text{year}^{-1}$ (Fig. 11B).

The distribution of the Arctic versus boreal taxa of the Barents Sea. The distribution of the BGI values (see “Material and Methods”) in the Barents Sea during 2005–2017 showed Arctic species dominating in the northern and eastern sectors of the Barents Sea, while the southern and western areas were dominated by the boreal species. These two regions are separated by a boreal-Arctic boundary line that has varied over time (Fig. 12).

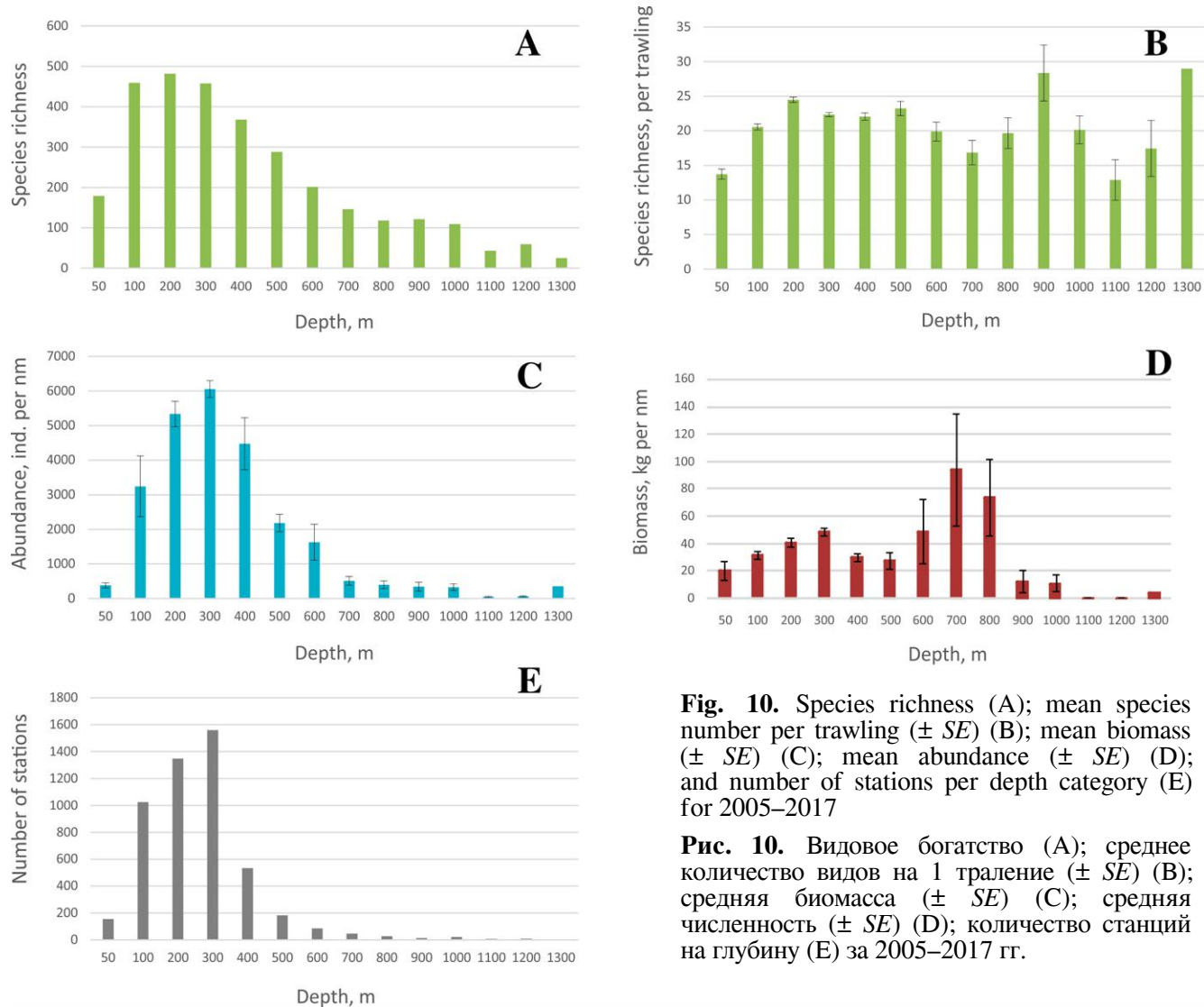


Fig. 10. Species richness (A); mean species number per trawling ($\pm SE$) (B); mean biomass ($\pm SE$) (C); mean abundance ($\pm SE$) (D); and number of stations per depth category (E) for 2005–2017

Рис. 10. Видовое богатство (A); среднее количество видов на 1 траление ($\pm SE$) (B); средняя биомасса ($\pm SE$) (C); средняя численность ($\pm SE$) (D); количество станций на глубину (E) за 2005–2017 гг.

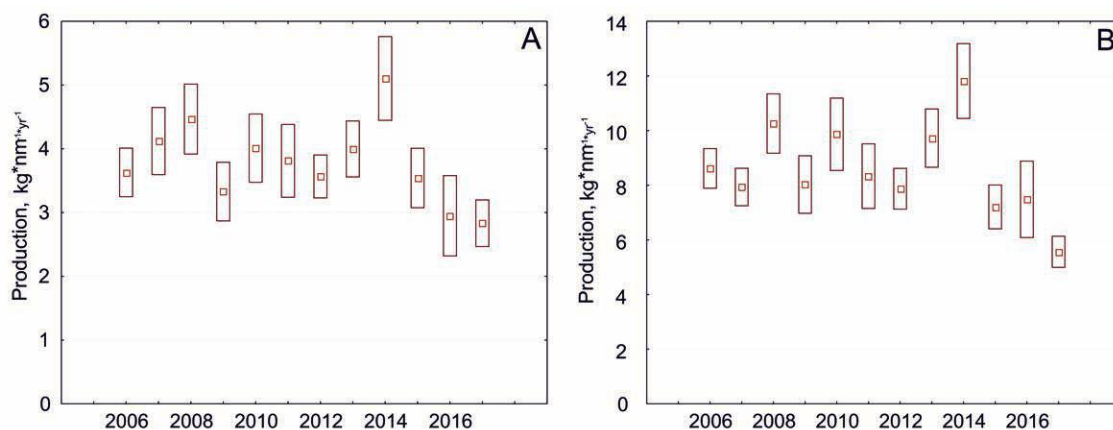


Fig. 11. Inter-annual variation of mean megabenthic production ($\pm SE$) in the Barents Sea in 2006–2017 calculated with two different P/B ratios: A) Degen *et al.* [11] and B) Manushin [37]

Рис. 11. Варьирование продукции мегабентоса ($\pm SE$) в Баренцевом море в 2006–2017 гг., рассчитанной с использованием двух разных коэффициентов P/B: А) по Деген с соавторами [11]; В) по Манушину [37]

The location of the boreal-Arctic boundary line closely follows three main currents of Atlantic water in the Barents Sea: along the western slope of the Barents Sea shelf, to the Central Bank, and along the western shelf of the Novaya Zemlya archipelago (see also Fig. 1 A).

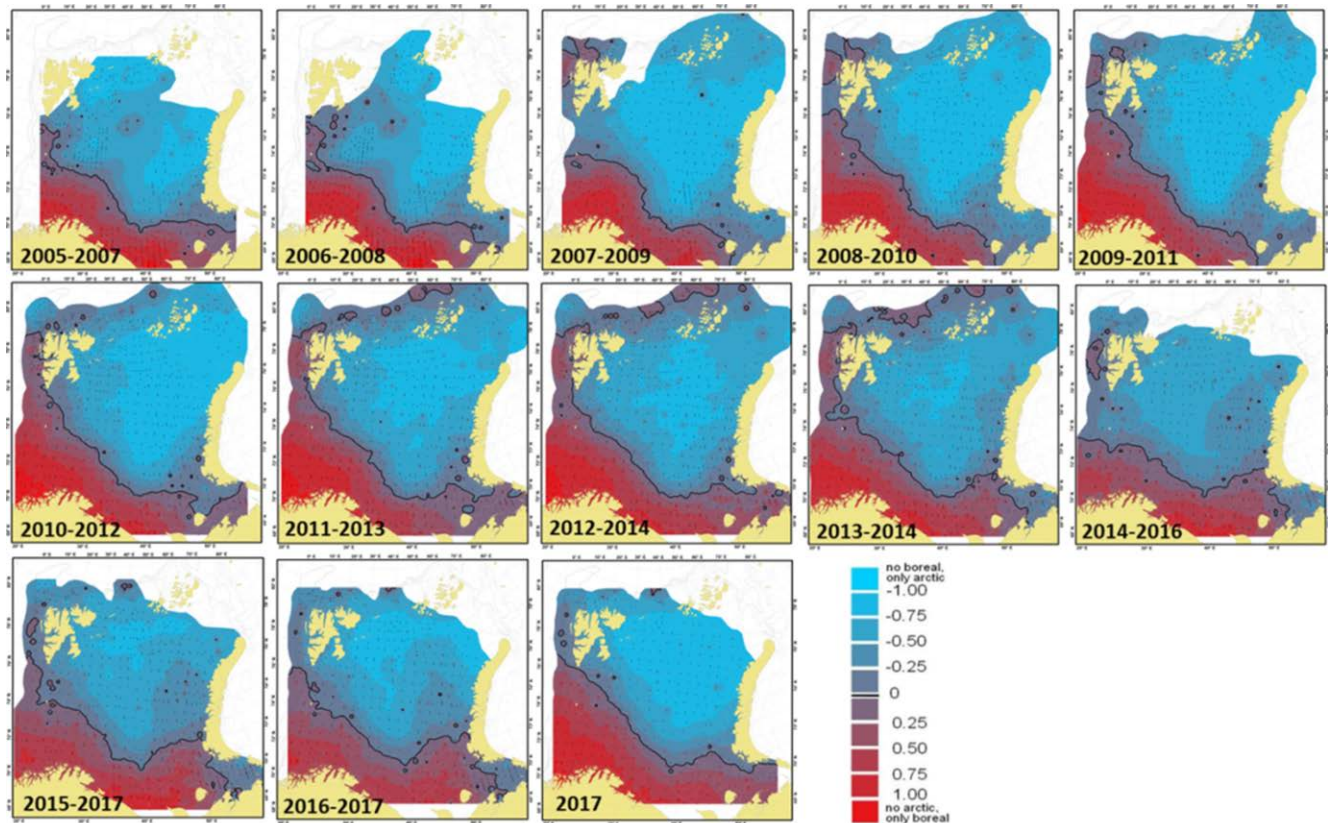


Fig. 12. Temporal distribution of the Arctic (blue) and boreal (red) areas of the Barents Sea (2005–2017). The black line shows the position of the boreal-Arctic boundary

Рис. 12. Временное распределение арктических (синие) и бореальных (красные) областей в Баренцевом море в 2005–2017. Чёрная линия показывает положение бореально-арктической границы

The position of the boreal-Arctic boundary ($BGI = 0$) varied between years and locations (Fig. 13). In the southeastern part of the sea, the positions of the boundary have changed spatially by approximately 150–200 nm during 2005–2017, around 150 nm on the Spitsbergen Bank, and less than 50 nm in the central part of the sea.

The inter-annual fluctuation in the boreal-Arctic boundary position is most distinctive in the southeastern part of the Barents Sea. The results show that the boundary moved towards the southwest (upper five pictures in Fig. 12) during 2006–2010, indicating a prevalent distribution of Arctic species over boreal, while over the course of the next six years (2011–2016) it moved back in a northwards direction.

An area-based mean BGI for the central-southern part of the Barents Sea (Fig. 14) demonstrated a prevalence of Arctic species during 2007–2014, with a minimum value in 2010, followed by a prevalence of boreal species during 2014–2017. The years 2005 and 2014 are excluded from the calculation due to the lack of Norwegian data. The lowest and highest presence for boreal species in the constrained area is observed in 2010 and 2015–2016, respectively. Values below zero indicate the dominance of Arctic biomass, while values above zero indicate boreal dominance in the defined area (see embedded map in Fig. 14).

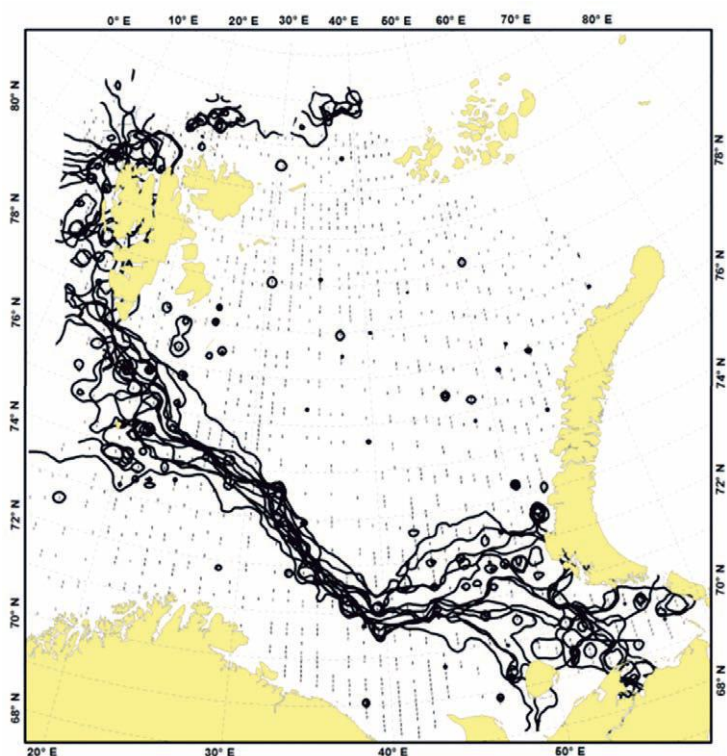


Fig. 13. Annual position of the boreal-Arctic boundary (BGI = 0) calculated 2005 to 2017

Рис. 13. Положение boreально-арктической границы (биogeографический индекс BGI = 0) в 2005–2017 гг.

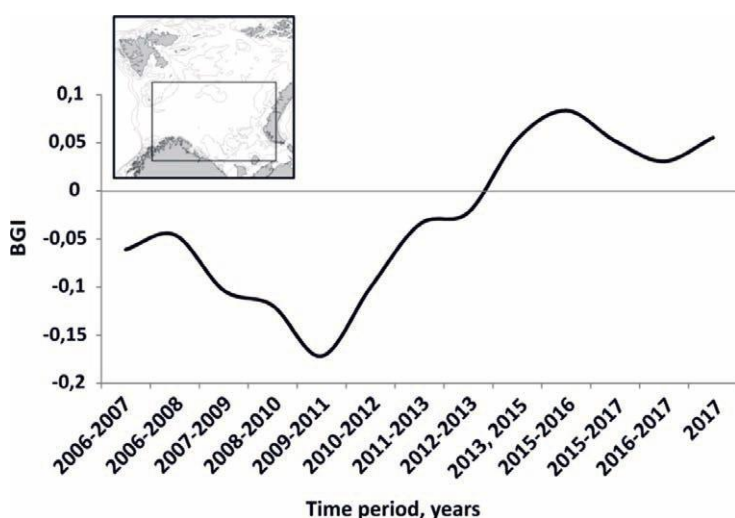


Fig. 14. Temporal variation of the mean BGI calculated for the central-southern Barents Sea constrained by N69–76°, E20–55° (map embedded) (2006–2017)

Рис. 14. Варьи́рование среднего значения биogeографического индекса BGI, рассчитанного для акватории Баренцева моря, ограниченной N69–76°, E20–55° (карта встроена) (2006–2017)

DISCUSSION

Throughout 13 years (2005–2017) of annual monitoring of the benthic megafauna, 21 % of 3245 species previously known [36] from Barents Sea, have been recorded. More than 5000 stations, 200 tons, and 14 million individuals of megafauna have been sampled. This achievement has become possible with using existing annual stock surveys, already being conducted by national governmental institutions, with the addition of benthic expertise, thereby making it possible to identify and evaluate the benthic by-catch from the commercial fish/shrimp trawl. It has proven to be a time- and cost-efficient approach for conducting long-term monitoring of the benthic habitats without additional seabed impact.

As the surveys were carried out using a trawl, animals in the catch were characterized by size as megabenthos [1]. Previous studies of zoobenthos mainly used material collected by grabs [15], but trawls and dredges of various design are better suited for sampling large invertebrates [17]. This was confirmed when studying the echinoderm fauna in the Kara Sea [2]. Taking into account the fact that the distribution,

contribution to production, and gross biomass of 694 species (1058 taxa) studied here have been previously undervalued, it is therefore assumed that zoobenthos in previous studies had not been fully taken into account.

In 2005–2014 (the first nine years of investigation), the mean biomass and production values of the benthic megafauna were mostly stable, but they tended to decline after 2014.

The spatial distribution of the biomass showed that the highest values of megabenthos were recorded on the continental slope in the areas of hydrological fronts where water masses meet [39 ; 40 ; 42]. Similar results have previously been obtained for macrobenthos in the Barents Sea [2 ; 9 ; 14 ; 15 ; 34 ; 41], indicating that the same environmental factors are structuring these two faunal components. Prior to the ecosystem survey of the Barents Sea, however, there was no data on the distribution of megabenthic organisms in the Barents Sea, thus making it difficult to compare megabenthic and macrobenthic parts of the communities.

The depth range of 100–300 m accounted for 65 % of sea area [34] and included 79.5 % of the total number of stations used in the ecosystem survey, meaning that the investigated area was approximately evenly covered by bottom trawling. The highest species variety was observed in the 100–400-m depth layer, and a reduction in the number of species coincided with an increase in depth. This is also in accordance with prior investigations of macrobenthos [24], and has previously been explained by the depletion of food resources [34]. However, the mean numbers of species per trawling (Fig. 10B) show that species diversity in general is remarkably high in both shallow coastal areas and deep sea of the investigated parts of the Barents Sea.

The largest average catches of megabenthic fauna were taken at a depth range of 600–800 m, along the continental slope of the western and northern parts of the Barents Sea. Communities of high benthic biomass (predominantly sponges) have previously been reported [9 ; 34] in the area of the warm Atlantic Current of the West-Spitsbergen branch [39 ; 40 ; 42] and in Saint Anna Trough near Franz Josef Land [22] where they filtrate water current for food particles.

The average biomass of Arthropoda was at its highest in 2006–2007, coinciding with the introduction of red king crab (*Paralithodes camtschaticus*) to the southern part of the Barents Sea, and in 2013–2016, when the population of snow crab (*Chionoecetes opilio*) rose dramatically in the eastern part of the Barents Sea. The decrease in crustacean catches in recent years is most likely related to the spreading of snow crab over a larger area and the beginning of fishing in the areas of its maximum concentrations in the eastern part of the Barents sea in 2016 [48], where up to 8,000 tons of crab are caught annually.

It can be suggested that the decline observed in the biomass of Cnidaria and Echinodermata after 2014, was caused by predation and competition from the snow crab. Echinoderms and cnidarians are frequently found in crab stomachs [54], which may indicate feeding on these animals by large populations of snow crab.

Apart from a few exceptions, the Mollusca biomass tended to increase until 2016. Taking into account only the area populated by snow crab, the average biomass of Mollusca has increased, while across the Barents Sea as a whole, biomass was stable, which suggests that snow crabs may have only a small influence on the Mollusca biomass.

Molluscs are one of the main macrobenthic groups in snow crab diet [54]. However, large molluscs with strong shells, that could be caught by trawls, were not present in its diet, which suggests that the biomass of large molluscs is driven by other factors.

Both methods used to calculate the inter-annual variation of the megabenthic production in the Barents Sea showed similar trends; however, the use of Manushin formula doubled the resulting values of production. Using the mean biomass (27 kg·nm⁻¹), the annual P/B ratio was calculated to be 0.14 [11] and 0.3 [37]. There is a difference between the P/B ratio calculated by the Degen *et al.* method in this paper (0.14) and the value in the original article (0.15) [11]. This difference is explained by the selection of area of the Barents Sea (see “[Material and Methods](#)”), exclusion of catches > 1 ton, and the longer research period. It is assumed that the values obtained from the calculation with using the Manushin method [37]

are more realistic because his formula is based on taxonomic status and an individual average body weight of ectothermic animals. It could be suggested that Degen *et al.* [11] calculations had not taken into account small-sized groups of animals, due to the low catchability of small animals by the Campelen trawl. In Manushin formula [37], this underestimation is minimized because both available materials and author's own data are used to create production equation for a wide size range of animals. Similar results were obtained in a study of scallop (*Chlamys islandica*) near the Kola Peninsula, being a similar megabenthos size group, where P/B ratio was estimated to be 0.25 [13]. Comparing P/B ratio of macrobenthos (0.2–5.3; mean (1.44 ± 0.06) [54]) and megabenthos (0.3), the level of megabenthic production seems to be realistic.

The boreal-Arctic boundary line in the Barents Sea (also called the biogeographical border between the Arctic and boreal regions) has been known since the mid-XIX century, but without general consensus of its position due to different criteria for setting the biogeographical boundaries [27].

The results from this research show that, in the current warm period, the majority of the Barents Sea is in an intermediate state between the Arctic and boreal regions due to the wide distribution of boreal species toward the north. Dynamics of BGI mean value within the central-southern part of the Barents Sea (see Fig. 14) suggests that since 2013, a larger part of the Barents Sea could be characterized as a predominantly boreal intermediate area. Moreover, it is suggested that the shift in the boundary line between the Arctic and boreal areas toward its most southern position in 2009–2011 may have been caused by the coldest year prior to the research period (2003, *i. e.*, six to eight years beforehand), resulting in the largest negative anomaly for the megabenthos biomass.

Acknowledgement. We acknowledge the joint Norwegian-Russian Ecosystem Survey of IMR and PINRO and all colleagues and staff on the ships, in the laboratories, and in the offices. We appreciate the help of Claude Nozères (Maurice Lamontagne Institute) and Stephen Long (Zoological Society of London) who made valuable corrections and remarks to the manuscript. We would like to thank the anonymous reviewers of the manuscript for useful comments.

REFERENCES / СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Atlas of the megabenthic organisms of the Barents Sea and adjacent waters.* Murmansk : PINRO, 2018, 534 p. (in Russ.)
2. Anisimova N. A. Echinoderms of the southern part of the Kara Sea. In: *Fauna of the invertebrates of the Barents, the Kara and the White Seas* / G. G. Matishov (Ed.). Apatity : KSC RAS, 2003, pp. 111–130. (in Russ.)
3. Antipova T. V. Echinoderms of the southern part of the Kara Sea. *Trudy of the Knipovich Polar Research Institute of Marine Fisheries and Oceanography*, 1975, iss. 35, pp. 121–124. (in Russ.)
4. Årthun M., Eldevik T., Smedsrud L. H., Skagseth Ø., Ingvaldsen R. B. Quantifying the influence of Atlantic heat on Barents Sea ice variability and retreat. *Journal of Climate*, 2012, vol. 25, iss. 13, pp. 4736–4743. <https://doi.org/10.1175/JCLI-D-11-00466.1>
5. Asplin L., Ingvaldsen R., Loeng H., Sætre R. *Transport of Atlantic Water in the western Barents Sea.* [Copenhagen : International Council for the Exploration of the Sea, 2001]. (ICES CM 2001/W:03).
6. Blacker R. W. Recent changes in the benthos of the West Spitsbergen fishing grounds. *Special Publication of the International Commission for the Northwest Atlantic Fisheries*, 1965, no. 6, pp. 791–794.
7. Bluhm B. A., Iken K., Hardy S. M., Sirenko B. I., Holladay B. A. Community structure of epibenthic megafauna in the Chukchi Sea. *Aquatic Biology*, 2009, vol. 7, no. 3, pp. 269–293. <https://doi.org/10.3354/ab00198>
8. Boitsov V. D., Karsakov A. L., Trofimov A. G. Atlantic water temperature and climate in the Barents Sea, 2000–2009. *ICES Journal of Marine Science*, 2012, vol. 69, iss. 5, pp. 833–840. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fss075>
9. Brotskaya V. A., Zenkevich L. A. Quantitative evaluation of the bottom fauna of the Barents Sea. *Transactions of the Institute of Marine Fisheries and Oceanography of the USSR*, 1939, vol. 4, pp. 5–98. (in Russ.) ; pp. 99–126. (Summ. in Engl.)
10. Cheung W. W., Lam V. W., Sarmiento J. L., Kearney K., Watson R., Pauly D. Projecting

- global marine biodiversity impacts under climate change scenarios. *Fish and Fisheries*, 2009, vol. 10, iss. 3, pp. 235–251. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2979.2008.00315.x>
11. Degen R., Jørgensen L. L., Lubin P., Ellingsen I. H., Pehlke H., Brey T. Patterns and drivers of megabenthic secondary production on the Barents Sea shelf. *Marine Ecology Progress Series*, 2016, vol. 546, pp. 1–16. <https://doi.org/10.3354/meps11662>
 12. Denisenko S. G. Zoobentos Barentseva morya v usloviyakh izmenyayushchegosya klimata i antropogenogo vozdeistviya. In: *Dinamika morskikh ekosistem i sovremennye problemy sokhraneniya biologicheskogo potentsiala morei Rossii*. Vladivostok : Dal'nauka, 2007, pp. 418–511. (in Russ.)
 13. Denisenko S. G. *Ekologiya i resursy islandskogo grebeshka v Barentsevom more*. Apatity : Kol'skii nauchnyi tsentr AN SSSR, 1989, 138 p. (in Russ.)
 14. Denisenko S. G. Long-term changes of zoobenthos biomass in the Barents Sea. *Proceedings of the Zoological Institute of Russian Academy of Sciences*, 2001, vol. 289, pp. 59–66.
 15. Denisenko S. G. *Bioraznoobrazie i bioresursy makrozoobentosa Barentseva morya: struktura i mnogoletnie izmeneniya*. Saint Petersburg : Nauka, 2013, 284 p. (in Russ.)
 16. Dyer M. F., Cranmer G. J., Fry P. D., Fry W. G. The distribution of benthic hydrographic indicator species in Svalbard waters, 1978–1981. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1984, vol. 64, iss. 3, pp. 667–677. <https://doi.org/10.1017/S0025315400030332>
 17. Filatova Z. A., Zenkevich L. A. Kolichestvennoe raspredelenie donnoi fauny Karskogo morya. *Trudy Vsesoyuznogo gidrobiologicheskogo obshchestva*, 1957, vol. 8, pp. 3–67. (in Russ.)
 18. Fossheim M., Primicerio R., Johannessen E., Ingvaldsen R. B., Aschan M. M., Dolgov A. D. Recent warming leads to a rapid borealization of fish communities in the Arctic. *Nature Climate Change*, 2015, vol. 5, iss. 7, pp. 673–677. <https://doi.org/10.1038/nclimate2647>
 19. Frainer A., Primicerio R., Kortsch S., Aune M., Dolgov A. V., Fossheim M., Aschan M. M. Climate-driven changes in functional biogeography of Arctic marine fish communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, vol. 114, no. 46, pp. 12202–12207. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706080114>
 20. Franke R. Scattered data interpolation: Test of some methods. *Mathematics of Computations*, 1982, vol. 33, no. 157, pp. 181–200. <https://doi.org/10.2307/2007474>
 21. Galkin Y. I. Long-term changes in the distribution of mollusks in the Barents Sea related to the climate. *Berichte der Polarforschung*, 1998, vol. 287, pp. 100–143.
 22. Galkin S. V., Vedenin A. A., Minin K. V., Rogacheva A. V., Molodtsova T. N., Rajskiy A. K., Kucheruk N. V. Macrozoobenthos of southern part of St. Anna Trough and adjacent Kara Sea shelf. *Oceanology*, 2015, vol. 55, iss. 4, pp. 614–622. <https://doi.org/10.1134/S0001437015040098>
 23. Grebmeier J. M., Smith W. O., Conover R. J. Biological processes on Arctic continental shelves: Ice-Ocean-Biotic interactions. In: *Arctic Oceanography: Marginal Ice Zones and Continental Shelves* / W. O. Smith, J. M. Grebmeier (Eds). Washington, DC : American Geophysical Union, 1995, pp. 231–261. (Coastal and Estuarine Studies ; vol. 49). <https://doi.org/10.1029/CE049p0231>
 24. Herman Y. (Ed.) *The Arctic Seas: Climatology, Oceanography, Geology, and Biology*. Boston, MA : Springer, 1989, 888 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0677-1>
 25. Hoegh-Guldberg O., Bruno J. F. The impact of climate change on the world's marine ecosystems. *Science*, 2010, vol. 328, iss. 5985, pp. 1523–1528. <https://doi.org/10.1126/science.1189930>
 26. *Interim Report of the Working Group on the Integrated Assessments of the Barents Sea (WGIBAR)*, 9–12 March, 2018, Tromsø, Norway. Copenhagen, Denmark : International Council for the Exploration of the Sea, 2018, 210 p. (WGIBAR 2018 Report ; ICES CM 2018/IEASG: 04).
 27. Jirkov I. A. Biogeography of the Barents Sea benthos. *Invertebrate Zoology*, 2013, vol. 10, iss. 1, pp. 69–88.
 28. Johannessen E., Høines Å. S., Dolgov A. V., Fossheim M. Demersal fish assemblages and spatial diversity patterns in the Arctic-Atlantic transition zone in the Barents Sea. *PLoS One*, 2012, vol. 7, iss. 4, art. E34924 (14 p.). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034924>
 29. Johannessen E., Jørgensen L. L., Fossheim M., Primicerio R., Greenacre M., Lubin P., Dolgov A. V., Ingvaldsen R. B., Anisimova N. A., Manushin I. E. Large-scale patterns in community structure of benthos and fish in the Barents Sea. *Polar Biology*, 2017, vol. 40, iss. 2, pp. 237–246. <https://doi.org/10.1007/s00300-016-1946-6>

30. Jørgensen L. L., Ljubin P., Skjoldal H. R., Ingvaldsen R. B., Anisimova N., Manushin I. Distribution of benthic megafauna in the Barents Sea: Baseline for an ecosystem approach to management. *ICES Journal of Marine Science*, 2015, vol. 72, iss. 2, pp. 595–613. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsu106>
31. Jørgensen L. L., Primicerio R., Ingvaldsen R. B., Fossheim M., Strelkova N., Thangstad T. H., Zakharov D. Impact of multiple stressors on sea bed fauna in a warming Arctic. *Marine Ecology Progress Series*, 2019, vol. 608, pp. 1–12. <https://doi.org/10.3354/meps12803>
32. Klages M., Boetius A., Christensen J. P., Deube H., Piepenburg D., Schewe I., Soltwedel T. The benthos of Arctic seas and its role for the organic carbon cycle at the seafloor. In: *The Organic Carbon Cycle in the Arctic Ocean* / R. Stein, R. W. MacDonald (Eds). Berlin ; Heidelberg : Springer, 2004, pp. 139–167. https://doi.org/10.1007/978-3-642-18912-8_6
33. Kortsch S., Primicerio R., Fossheim M., Dolgov A. V., Aschan M. Climate change alters the structure of arctic marine food webs due to poleward shifts of boreal generalists. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2015, vol. 282, iss. 1814, art. 20151546 (9 p.). <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1546>
34. Kuznetsov A. P. On the distribution of trophic groupings of bottom invertebrates in the Barents Sea. *Transactions of the P. Shirshov Institute of Oceanology*, 1970, vol. 88, pp. 5–80. (in Russ.)
35. Lind S., Ingvaldsen R. B. Variability and impacts of Atlantic water entering the Barents Sea from the north. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 2012, vol. 62, pp. 70–88. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2011.12.007>
36. *List of Species of Free-living Invertebrates of Eurasian Arctic Seas and Adjacent Deep Waters* / B. I. Sirenko (Ed.). Saint Petersburg : Zoological Institute RAS, 2001, 129 p. (Explorations of the Fauna of the Seas ; iss. 51 (59)).
37. Manushin I. E. Srednyaya massa osobi kak pokazatel' skorosti oborota veshchestva v populyatsiyakh vodnykh ektotermnykh zhyvotnykh. In: *Materialy X nauchnogo seminara "Chteniya pamyati K. M. Deryugina"*. Saint Petersburg : KopiServis, 2008, pp. 29–34. (in Russ.)
38. Manushin I. E., Anisimova N. A., Lyubin P. A., Dahle S., Cochrane S. Mnogoletnie izmeneniya v makrozoobentose yugo-vostochnoi chasti Barentseva morya. In: *Materialy XIV nauchnogo seminara "Chteniya pamyati K. M. Deryugina"*. Saint Petersburg : SpbGU, 2012, pp. 33–45. (in Russ.)
39. Matishov G. G., Volkov V. A., Denisov V. V. Structure of warm Atlantic water circulation in the Northern Barents. *Doklady Russian Academy of Sciences*, 1998, vol. 362, no. 4, pp. 553–556. (in Russ.)
40. Matishov G. G., Matishov D. G., Moiseev D. V. Inflow of Atlantic-origin waters to the Barents Sea along glacial troughs. *Okeanologia*, 2009, no. 51 (3), pp. 321–340.
41. Nesis K. N. Izmeneniya donnoi fauny Barentseva morya pod vliyaniem kolebanii gidrologicheskogo rezhima (na razreze po Kol'skomu meridianu). In: *Sovetskie rybokhozyaistvennye issledovaniya v moryah Evropeiskogo Severa*. Moscow : Pishchepromizdat, 1960, pp. 129–138. (in Russ.)
42. Ozhigin V. K., Ivshin V. A. *Vodnye massy Barentseva morya*. Murmansk : Izd-vo PINRO, 1999, 48 p. (in Russ.)
43. Ozhigin V. K., Ivshin V. A., Trofimov A. G., Karsakov A. L., Antsiferov M. Yu. *Waters of the Barents Sea: Structure, circulation, variability*. Murmansk : PINRO, 2016, 260 p. (in Russ.)
44. Oziel L., Sirven J., Gascard J.-C. The Barents Sea frontal zones and water masses variability (1980–2011). *Ocean Science*, 2016, vol. 12, iss. 1, pp. 169–184. <https://doi.org/10.5194/os-12-169-2016>
45. Roy V., Iken K., Archambault P. Regional variability of megabenthic community structure across the Canadian Arctic. *Arctic*, 2015, vol. 68, no. 2, pp. 180–192.
46. Shorygin A. A. Iglokozhiye Barentseva morya. *Trudy Morskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta*, 1928, vol. 3, no. 4, 128 p. (in Russ.)
47. Smedsrud L. H., Esau I., Ingvaldsen R. B., Eldevik T., Haugan P. M., Li C., Lien V. S., Abdirahman A. O., Omar M., Otterå O. H., Risebrobakken B., Sandø A. B., Semenov V. A., Sorokina S. A. The role of the Barents Sea in the Arctic climate system. *Reviews of Geophysics*, 2013, vol. 51, iss. 3, pp. 415–449. <https://doi.org/10.1002/rog.20017>
48. Sokolov K. M., Pavlov V. A., Strelkova N. A. et al. *Snow crab Chionoecetes opilio in the Barents and Kara seas*. Murmansk : PINRO, 2016, 242 p. (in Russ.)
49. Tantsyura A. I. On seasonal changes of currents in the Barents Sea. *Trudy of the Knipovich Polar*

- Research and Designing Institute of Marine Fisheries and Oceanography*, 1973, iss. 34, pp. 108–112. (in Russ.)
50. Vassilenko S. V., Petryashov V. V. (Eds). *Illustrated Keys to Free-living Invertebrates of Eurasian Arctic Seas and Adjacent Deep Waters. Vol. 1: Rotifera, Pycnogonida, Cirripedia, Leptostraca, Mysidacea, Hyperiidea, Caprellidea, Euphausiacea, Dendrobranchiata, Pleocyemata, Anomura, and Brachyura*. Fairbanks, Alaska : Alaska Sea Grant College Program, University of Alaska Fairbanks ; Zoological Institute, Russian Academy of Sciences, 2009, 192 p. <https://doi.org/10.4027/ikflieasdw.2009>
51. Walsh S. J., McCallum B. R. Performance of the Campelen 1800 shrimp trawl during the 1995 Northwest Atlantic Fisheries Centre autumn groundfish survey. *Northwest Atlantic Fisheries Organization Scientific Council Studies*, 1997, no. 29, pp. 105–116.
52. Zakharov D. V., Anisimova N. A., Stepanenko A. M. First record of the sea star *Porania pulvillus* (O. F. Müller, 1776) in Russian part of the Arctic. *Russian Journal of Biological Invasions*, 2016, vol. 7, iss. 4, pp. 321–323. <https://doi.org/10.1134/S207511171604010X>
53. Zakharov D. V., Jørgensen L. L. New species of the gastropods in the Barents Sea and adjacent waters. *Russian Journal of Biological Invasions*, 2017, vol. 8, iss. 3, pp. 226–231. <https://doi.org/10.1134/S2075111717030146>
54. Zakharov D. V., Manushin I. E., Strelkova N. A., Pavlov V. A., Nosova T. B. Diet of the snow crab in the Barents Sea and macrozoobenthic communities in the area of its distribution. *Trudy VNIRO*, 2019, vol. 172, pp. 70–90. (in Russ.). <https://doi.org/10.36038/2307-3497-2018-172-70-90>

МЕГАБЕНТОС БАРЕНЦЕВА МОРЯ: ПРОСТРАНСТВЕННО-ВРЕМЕННОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И ПРОДУКЦИОННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Д. В. Захаров^{1,2}, Л. Л. Йоргенсен³, И. Е. Манушин¹, Н. А. Стрелкова¹

¹Полярный филиал ФГБНУ «ВНИРО» («ПИНРО» имени Н. М. Книповича),
Мурманск, Российская Федерация

²Мурманский морской биологический институт РАН, Мурманск, Российская Федерация

³Институт морских исследований, Тромсё, Норвегия
E-mail: zakharden@yandex.ru

Представлены результаты программы мониторинга мегабентоса Баренцева моря и сопредельных акваторий, выполняемой Россией и Норвегией с 2005 г. Мегабентос является одним из важнейших компонентов донной составляющей экосистемы Баренцева моря, формируя значительную долю живого вещества, включённого в пищевые цепи и систему экологических взаимоотношений. В частности, организмы мегабентоса играют существенную, а зачастую и определяющую роль в питании донных рыб и ракообразных Баренцева моря, в том числе важнейших промысловых видов: трески, пикши, камчатского краба, краба-стригуна опилю и др. Нередко представители данной группы формируют специфические биотопы, определяющие условия существования множества других видов животных. Постепенное накопление знаний о мегабентосе позволит оценить его роль в экосистеме и в конечном итоге поспособствует рациональному управлению ресурсами Баренцева моря. Основная цель нашего исследования — описать пространственное распределение и выявить динамику биомассы и продукции мегабентоса в Баренцевом море. С 2005 г. в рамках оценки запасов промысловых видов рыб и беспозвоночных проводится обработка прилова мегабентоса из донных тралений. За 2005–2017 гг. выполнено 5016 траловых станций, обработано 238,4 т валовой биомассы мегабентоса, просмотрено около 14,9 млн экз. животных. Материал собирали с помощью донного трала Campelen 1800 — низкоселективного активного сетного орудия лова, выполненного из капроновой дели с шагом ячеи 125 мм, с мелкоячеистой сетной кустовой вставкой с размером ячеи 22 мм и резиновым грунтопом типа «рокхоппер» с диаметром катков 40 см. Для удобства сравнительного анализа количественные параметры, представленные в статье, рассчитывали на стандартную дистанцию траления в 1 морскую милю (nm). Обработку материала проводили на борту судна непосредственно между постановками тралов. В ходе исследования зарегистрировано 694 вида мегабентоса; высокое видовое разнообразие зафиксировано

на глубинах 100–400 м, наибольшие средние значения биомассы и численности отмечены на глубинах 600–800 м. Биомасса (В) и продукция (Р) мегабентоса были стабильны на протяжении первых девяти лет исследований, но после 2014 г. появилась тенденция к их снижению. Значение коэффициента Р/В для мегабентоса оценивается на уровне 0,3. Предполагается, что предыдущие исследования бентоса в Баренцевом море недооценивали вклад как минимум 694 видов из группы мегабентоса в видовое богатство, валовую биомассу, численность и продукцию. Динамика биогеографического индекса (граница между бореальной и арктической зонами) в южной части Баренцева моря позволяет предположить, что с 2013 г. большую часть моря можно охарактеризовать как бореальную промежуточную область.

Ключевые слова: Арктика, Баренцево море, мегабентос, климат, Атлантическое течение, продукция, видовое богатство

УДК 594.124:577.115:628.193(262.5)

СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ТРОХОФОРАХ МИДИЙ *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*, ВЫРАЩЕННЫХ В УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЁННОСТИ ПОЛИХЛОРБИФЕНИЛАМИ

© 2020 г. Л. Л. Капранова, Л. В. Малахова, М. В. Нехорошев, В. В. Лобко, В. И. Рябушко

Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,
Севастополь, Российская Федерация
E-mail: lar_sa1980@mail.ru

Поступила в редакцию 16.07.2019; после доработки 14.04.2020;
принята к публикации 26.06.2020; опубликована онлайн 30.06.2020.

Состояние черноморских популяций *Mytilus galloprovincialis* в естественной среде обитания напрямую зависит от развития мидии на всех стадиях, в том числе на начальных стадиях личиночных форм, наиболее чувствительных к загрязнению окружающей среды. Поллютанты органического происхождения оказывают негативное влияние на личинки моллюска, проявляющееся в торможении их роста и развития. Закономерности размножения мидии хорошо изучены, что даёт возможность получать в контролируемых лабораторных условиях личинки из искусственно оплодотворённых яйцеклеток этого вида моллюсков. В работе впервые исследован жирнокислотный состав общих липидов, выделенных из биомассы тканей личинок *M. galloprovincialis* на стадии трохофоры в контроле и после их трёхдневной экспозиции в среде с добавлением различных концентраций полихлорбифенилов. Жирнокислотный состав суммарных липидов в биомассе личинок, полученных на третьи сутки эксперимента, исследовали методом хромато-масс-спектрометрии. Всего идентифицировано 14 жирных кислот: 59 % из них относились к насыщенным, 24 % — к моноеновым, 17 % — к полиеновым. Для статистического анализа использовали программу MATLAB (версия 8.2). В условиях проведённого эксперимента в липидах трохофор *M. galloprovincialis* достоверно отличались значения суммы мононенасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот. Сумма насыщенных жирных кислот статистически значимо не изменялась. Основными насыщенными жирными кислотами во всех исследуемых трохофорах мидий являлись пальмитиновая (C16:0) и стеариновая (C18:0). Их концентрации значительно не изменялись под действием полихлорбифенилов. Наиболее значимые мононенасыщенные жирные кислоты — олеиновая (C18:1 ω 9), пальмитолеиновая (C16:1 ω 7) и вакценовая (C18:1 ω 7). Содержание мононенасыщенных жирных кислот снижалось вдвое при действии полихлорбифенилов с концентрациями 0,1 и 1 мкг·л⁻¹; при концентрации полихлорбифенилов 10 мкг·л⁻¹ суммарное содержание этих кислот было равно таковому в контроле. Среди полиненасыщенных жирных кислот, обладающих положительной биологической активностью, были идентифицированы арахидоновая (C20:4 ω 6), эйкозапентаеновая (C20:5 ω 3) и докозагексаеновая (C22:6 ω 3). Суммарное содержание Омега-3 и Омега-6 кислот в личинках мидий в контрольном опыте не превышало 12,8 %. С увеличением концентрации полихлорбифенилов в среде выращивания трохофор с 0,1 до 1 мкг·л⁻¹ концентрация полиненасыщенных жирных кислот повышалась в 2,5 раза. При концентрации полихлорбифенилов 10 мкг·л⁻¹ и в пробе с ацетоном суммарное содержание полиненасыщенных жирных кислот было сопоставимо с таковым в контрольном опыте. Результаты исследования свидетельствуют о том, что жирнокислотный отклик трохофор мидий *M. galloprovincialis* максимален при воздействии концентраций полихлорбифенилов от 0,1 до 1 мкг·л⁻¹. При концентрации загрязнителей 10 мкг·л⁻¹ и выше биохимические процессы в личинках, по-видимому, замедляются. Результаты данного исследования могут способствовать лучшему пониманию перестроек, позволяющих моллюскам на личиночных стадиях развития адаптироваться к условиям загрязнения среды обитания органическими поллютантами.

Ключевые слова: полихлорбифенилы, жирные кислоты, личинки, трохофора, мидия *Mytilus galloprovincialis*, Чёрное море

Изучению влияния загрязнённости мидий *Mytilus galloprovincialis*, обитающих в природных условиях севавтопольской морской акватории и культивируемых в прибрежных марихозьяствах, посвящён ряд работ, в которых в основном рассмотрены взрослые особи [11 ; 12 ; 19 ; 24 ; 31] и их половые продукты [7].

Известно, что мидии устойчивы к различным видам загрязнения. Эти моллюски являются фильтраторами и активно накапливают поллютанты в организме. Одни из наиболее токсичных загрязнителей окружающей среды — хлорорганические соединения (далее — ХОС). Широкая их распространённость в воде Чёрного моря определяла загрязнение естественных популяций моллюсков во многих районах севавтопольской морской акватории, поскольку мидии аккумулируют гидрофобные ХОС даже при относительно низкой их концентрации в морской воде. В мидиях из бухт Мартынова, Карантинная и Голубая суммарное содержание полихлорбифенилов (Σ ПХБ₆) изменялось от 3,8 нг·г⁻¹ в жабрах (здесь и далее — на сырую массу) до 459 нг·г⁻¹ в гепатопанкреасе [6]. В бух. Ласпи, где антропогенное влияние выражено не так сильно, концентрация ХОС была ниже и составляла от 0,21 нг·г⁻¹ в жабрах до 10,3 нг·г⁻¹ в гонадах [6]. Накопление ХОС в органах мидий положительно коррелировало с содержанием в них общих липидов [6]. Эмбрионы и личинки являются наиболее чувствительными стадиями онтогенеза мидий, и влияние загрязняющих веществ может привести к торможению и остановке их роста [8]. В экспериментальных условиях уже установлены хромосомные aberrации в клетках при воздействии растворов таких токсикантов, как поверхностно-активные вещества, на оплодотворённые яйцеклетки [9]. В последние годы нами *in vivo* показана положительная корреляционная связь содержания ХОС в воде со смертностью пелагической икры и отрицательная — с численностью личинок рыб на ранних этапах постэмбрионального развития [23].

Цель настоящей работы — определить состав жирных кислот трохофор культивируемой в Чёрном море мидии *M. galloprovincialis*, выращенной в условиях экспериментальной загрязнённости полихлорированными бифенилами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследований был выбран двустворчатый моллюск *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819, собранный в весенний период 2019 г. с коллекторов мидийно-устричной фермы в акватории бух. Карантинная (г. Севастополь, Крымский полуостров). Для подготовки исследования отбирали 150 экземпляров мидий с длиной раковины 7–10 см. В этот сезон моллюски находились преимущественно на нерестовой стадии развития.

Личинки получали в лабораторных условиях; помещение не содержало токсичных паров и газов. Температура воздуха в лаборатории составляла (20 ± 2) °С. Освещение в помещении было комбинированным [5]. Для очистки пищеварительного тракта 150 экз. мидий выдерживали 4 ч в профильтрованной морской воде, отобранной батометром в акватории бух. Карантинная. В районе фермы в период сбора мидий суммарная концентрация ПХБ в воде не превышала 3 нг·л⁻¹, что соответствовало среднему значению для открытых районов Чёрного моря [6 ; 10].

Каждого моллюска помещали макушкой вниз в стеклянный стакан объёмом 0,5 л. Посуда для эксперимента была химически чистой. В каждый стакан заливали очищенную с применением мембранного фильтра (размер пор — 3–5 мкм) и нагретую до +25 °С морскую воду таким образом, чтобы покрыть верхний край створок мидий, стимулируя тем самым нерест [3]. Морская вода, в которой проходили нерест и выращивание личинок, имела следующие физико-химические показатели: температура — +23...+25 °С; величина рН — 8,1–8,3; концентрация Ca²⁺ — 210–290 мг·л⁻¹; концентрация Mg²⁺ — 460–640 мг·л⁻¹; солёность — 18 ‰; насыщенность поверхностного слоя растворённым кислородом в воде — 100–110 %.

Во время нереста моллюсков, наступившего через 4 ч после его стимуляции, яйцеклетки осаждались на дно в виде ярко-оранжевого осадка, а сперма вымётывалась в воду в виде белого облака. После выделения половых продуктов моллюсков удаляли из стаканов. Полученные растворы с яйцеклетками объединяли и переносили в трёхлитровую ёмкость. В другую трёхлитровую ёмкость собирали растворы со спермой. Далее к раствору с яйцеклетками добавляли 10 мл раствора со спермой мидий. Поскольку процесс оплодотворения происходит быстро [16], через 3 мин. после соединения растворов в 5 отдельных реакторов объёмом 1 дм³ помещали по 0,5 дм³ воды с оплодотворёнными яйцеклетками. В три реактора добавили раствор смеси ПХБ в ацетоне (Ароклор 1254, Supelco, США). Воздействующая на личинок концентрация ПХБ в воде реакторов — 0,1; 1; 10 мкг·л⁻¹. В четвёртый реактор добавили растворитель ацетон в той же концентрации, что и в рабочих реакторах. Пятый реактор был контрольным. Эксперимент провели в трёх повторностях.

Температура в реакторах для выращивания личинок составляла (20 ± 2) °С. Освещение в реакторах было как искусственным (лампы дневного света), так и естественным. Комбинированная освещённость, измеренная люксметром Ю-116, не превышала 750 лк. Личинок мидии выращивали трое суток, пока они находились на эндогенном питании. На этой стадии только начинаются формирование пищеварительной системы и увеличение объёма полости тела [16].

Экстракция липидов и получение метиловых эфиров жирных кислот. Состав жирных кислот исследовали в суммарных липидах, выделенных из биомассы личинок, полученной на третьей сутки эксперимента (*in vitro*). Для этого личинок отделяли от воды фильтрацией (размер пор фильтра — 84 мкм), а затем смывали с поверхности фильтра смесью этанол : хлороформ (1:1) несколькими порциями по 5 мл. Полученный раствор объёмом 20 мл центрифугировали 10 мин. при 1500 об·мин.⁻¹ с двукратным объёмом дистиллированной воды. Капилляром отбирали нижний хлороформный слой. Хлороформную фракцию трижды промывали водой и упаривали на роторном испарителе. После упаривания хлороформа для омыления липидных остатков в колбу добавляли 5 мл раствора щёлочи в метаноле (10 мл 3 н. раствора NaOH и 90 мл 90%-ного метанола). Полученный раствор кипятили с обратным холодильником до полного омыления в течение 2 ч. После остывания к раствору добавляли несколько капель 1%-ного спиртового раствора фенолфталеина и трижды проводили экстракцию гексаном (по 5 мл). Водно-спиртовую фазу подкисляли соляной кислотой, добавляя 300 мкл 6 н. HCl. Затем проводили повторную экстракцию гексаном (по 5 мл 3–4 раза). Гексановую фракцию упаривали досуха на роторном испарителе при температуре +30...+35 °С; для метилирования к остатку добавляли 5 мл 3%-ного раствора хлористого водорода в метаноле. Смесь кипятили 2 ч с обратным холодильником и после охлаждения повторно трижды экстрагировали гексаном (по 5 мл). Гексановую фракцию фильтровали, используя беззольный фильтр. До определения метиловых эфиров жирных кислот (далее — МЭЖК) гексановую фракцию хранили не более суток при температуре +5 °С [4].

Идентификация метиловых эфиров жирных кислот. Идентификация МЭЖК выполнена в ЦКП «Спектрометрия и хроматография» ФИЦ ИнБЮМ на газовом хроматографе Кристалл 5000.2 (ЗАО СКБ «Хроматэк», г. Йошкар-Ола, РФ) с квадрупольным масс-детектором и капиллярной колонкой DB-5ms (Agilent Technologies) длиной 30 м, с внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной плёнки фазы 0,25 мкм. Измерения проводили в режиме ионизации электронным ударом 70 эВ. Газ-носитель — гелий; скорость потока — 1 мл·мин.⁻¹. Ввод пробы осуществляли без деления потока. Температура инжектора составляла +280 °С. Температура колонки была следующей: начальная температура +60 °С; задержка 1 мин.; промежуточная температура (1) +180 °С; скорость подъёма 20 °С·мин.⁻¹; промежуточная температура (2) +290 °С; скорость подъёма 5 °С·мин.⁻¹; конечная температура +325 °С; скорость подъёма 5 °С·мин.⁻¹; задержка 10 мин. Объём вводимой пробы составлял 1,0 мкл. Детектирование МЭЖК проводили по полному ионному току. Качественный анализ МЭЖК выполнен сравнением времён удерживания экспериментальных хроматограмм с хроматограммой стандартной смеси МЭЖК (Supelco 37 component FAME mix) и полученных масс-спектров

МЭЖК — с библиотекой NIST 14 со степенью совпадения более 92 %. Расчёт относительного содержания МЭЖК в образце проводили по методу процентной нормализации по площадям пиков. Среднеквадратическое отклонение выходного сигнала хроматографа не превышало 6 % [15].

Статистическая обработка данных. Для статистического анализа использовали пакет функций Statistical Toolbox, интегрированный в программу MATLAB (версия 8.2). Статистически значимые различия между выборками устанавливали согласно критерию Фишера и уточняющему тесту Тьюки — Крамера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что уровень накопления ПХБ мидиями зависит от ряда показателей: жирности тканей, размера моллюсков, стадии половой зрелости. Индивидуальные отличия этих показателей определяют широкие диапазоны варьирования содержания хлорорганических токсикантов в особях: концентрация ПХБ в мягких тканях мидий, собранных в одном районе, изменялась от 14 до 162 нг·г⁻¹ и в среднем составила 68 нг·г⁻¹ ($n = 24$). Сравнение уровня загрязнённости мидий с ПДК, равной 2000 нг·г⁻¹ для Σ ПХБ, согласно Техническому регламенту Таможенного союза [13], показывает отсутствие риска от употребления мидий с фермы для человека. Кроме того, согласно критериям, установленным в странах Евросоюза, качество мидий по этим показателям определяется как очень высокое, поскольку содержание ПХБ в мидиях не превышает 250 нг·г⁻¹ [16].

В проведённых экспериментах по влиянию экологически значимых доз ПХБ на личинки мидий определён их отклик на загрязнение, проявившийся в изменении жирнокислотного состава (табл. 1 и 2).

Таблица 1. Содержание жирных кислот (% от суммы) в общих липидах трохофор мидии *M. galloprovincialis*, выращенной в среде с различной концентрацией полихлорбифенилов

Table 1. Fatty acid fractions (% of the total) in trochophore lipids of mussel *M. galloprovincialis* grown in a medium with different concentrations of polychlorinated biphenyls

Идентифицированная жирная кислота	Контроль	Концентрация ПХБ, мкг·л ⁻¹			Ацетон
		0,1	1	10	
Лауриновая (додекановая) (C12:0)	1,4 ± 0,6	0,6 ± 0,3	1,3 ± 0,4	1,0 ± 0,3	1,4 ± 0,5
Миристиновая (тетрадекановая) (C14:0)	6,2 ± 0,2	5,7 ± 0,6	7,7 ± 0,7	6,4 ± 0,4	6,5 ± 0,6
Пентадекановая (пентадециловая) (C15:0)	4,4 ± 0,8	5,3 ± 1,1	8,5 ± 0,5	5,8 ± 0,2	4,7 ± 0,7
Пальмитолеиновая (цис-9-гексадеценная) (C16:1ω7)	11,0 ± 0,6	6,8 ± 0,6	7,0 ± 0,2	9,6 ± 0,4	10,8 ± 0,8
Пальмитиновая (гексадекановая) (C16:0)	29,3 ± 4,3	33,8 ± 0,4	30,1 ± 0,3	34,7 ± 0,6	31,7 ± 2,3
цис-10-гептадеценная (C17:1ω7)	3,9 ± 1,5	1,2 ± 0,4	1,2 ± 0,2	1,4 ± 0,4	2,4 ± 1,5
14-метилгексадекановая (антеизо-C17:0)	2,4 ± 0,5	1,8 ± 0,3	2,3 ± 0,2	2,0 ± 0,1	2,6 ± 0,8
Арахидоновая (цис,цис,цис,цис-5,8,11,14-эйкозатетраенная) (C20:4ω6)	1,3 ± 0,2	20,5 ± 1,5	12,8 ± 0,6	3,3 ± 0,3	1,0 ± 0,4
Линолевая (цис,цис-9,12-октадекадиенная) (C18:2ω6)	2,2 ± 0,6	3,0 ± 0,3	4,8 ± 0,6	1,3 ± 0,4	1,6 ± 0,7
Олеиновая (цис-9-октадеценная) (C18:1ω9)	14,4 ± 1,5	1,5 ± 0,2	1,2 ± 0,2	15,3 ± 0,4	14,6 ± 1,1
Вакценовая (цис-11-октадеценная) (C18:1ω7)	2,4 ± 0,3	5,8 ± 0,3	5,7 ± 0,2	2,4 ± 0,3	2,5 ± 0,7
Сумма двух изомеров октадеценных кислот	16,8 ± 1,8	7,3 ± 0,5	6,9 ± 0,4	17,7 ± 0,7	17,1 ± 1,8
Стеариновая (октадекановая) (C18:0)	14,4 ± 0,5	8,1 ± 0,4	10,3 ± 0,3	9,2 ± 0,3	13,3 ± 0,5
Эйкозапентаенная (цис,цис,цис,цис,цис-5,8,11,14,17-эйкозагексаенная, ЭПК) (C20:5ω3)	4,2 ± 0,6	3,0 ± 0,2	4,0 ± 0,1	4,6 ± 0,3	4,3 ± 0,3
Докозагексаенная (цис,цис,цис,цис,цис,цис-4,7,10,13,16,19-докозагексаенная, ДГК) (C22:6ω3)	2,4 ± 1,0	2,9 ± 0,2	3,1 ± 0,2	2,8 ± 0,4	2,5 ± 0,5
Сумма насыщенных жирных кислот (НЖК)	58,2	55,3	60,2	59,1	60,3
Сумма мононенасыщенных жирных кислот (МНЖК)	31,6	15,3	15,1	28,8	30,3
Сумма полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК)	10,2	29,4	24,7	12,1	9,5
Сумма ненасыщенных жирных кислот	41,8	44,7	39,8	40,9	39,8
Отношение суммы насыщенных кислот к сумме ненасыщенных жирных кислот	1,4	1,2	1,5	1,4	1,5

Таблица 2. Значимые отличия (обозначены плюсом) состава жирных кислот липидов трохофор мидии *M. galloprovincialis* при разных концентрациях загрязнителя согласно однофакторному дисперсионному анализу (число степеней свободы $df = 4$) и проверке по апостериорному критерию Тьюки — Крамера

Table 2. Significant differences (denoted by pluses) in fatty acid composition of mussel *M. galloprovincialis* trochophores as found from one-way ANOVA ($df = 4$) and Tukey – Kramer post-hoc test

Жирная кислота	Концентрация загрязнителя, мкг·л ⁻¹	Контроль	Концентрация загрязнителя, мкг·л ⁻¹			F	p
			0,1	1	10		
Лауриновая	0,1	-	—	-	-	0,620	0,66
	1	-	-	—	-		
	10	-	-	-	—		
	ацетон	-	-	-	-		
Миристиновая	0,1	-	—	-	-	1,81	0,20
	1	-	-	—	-		
	10	-	-	-	—		
	ацетон	-	-	-	-		
Пентадекановая	0,1	-	—	-	-	5,40	1,4·10 ⁻²
	1	+	-	—	-		
	10	-	-	-	—		
	ацетон	-	+	-	-		
Пальмитолеиновая	0,1	+	—	-	-	13,32	5,1·10 ⁻⁴
	1	+	-	—	-		
	10	-	-	-	—		
	ацетон	-	+	+	-		
Пальмитиновая	0,1	-	—	-	-	1,11	0,41
	1	-	-	—	-		
	10	-	-	-	—		
	ацетон	-	-	-	-		
цис-10-гептадеценовая	0,1	-	—	-	-	1,48	0,28
	1	-	-	—	-		
	10	-	-	-	—		
	ацетон	-	-	-	-		
14-метилгексадекановая	0,1	-	—	-	-	0,58	0,68
	1	-	-	—	-		
	10	-	-	-	—		
	ацетон	-	-	-	-		
Арахидоновая	0,1	+	—	-	+	124	1,8·10 ⁻⁸
	1	+	-	—	+		
	10	-	+	+	—		
	ацетон	-	+	+	-		
Линолевая	0,1	-	—	-	-	6,80	6,6·10 ⁻³
	1	-	-	—	+		
	10	-	-	+	—		
	ацетон	-	-	+	-		
Олеиновая	0,1	+	—	-	+	71,3	2,6·10 ⁻⁷
	1	+	-	—	+		
	10	-	+	+	—		
	ацетон	-	+	+	-		

Продолжение на следующей странице...

Жирная кислота	Концентрация загрязнителя, мкг·л ⁻¹	Контроль	Концентрация загрязнителя, мкг·л ⁻¹			F	p
			0,1	1	10		
Вакценовая	0,1	+	+	-	+	23,1	4,9·10 ⁻⁵
	1	+	-	+	+		
	10	-	+	+	+		
	ацетон	-	+	+	-		
Стеариновая	0,1	+	+	-	-	41,2	3,5·10 ⁻⁶
	1	+	-	+	-		
	10	+	-	-	+		
	ацетон	-	+	+	+		
Эйкозапентаеновая	0,1	-	+	-	-	3,52	5,0·10 ⁻²
	1	-	-	+	-		
	10	-	-	-	+		
	ацетон	-	-	-	-		
Докозагексаеновая	0,1	-	+	-	-	0,344	0,84
	1	-	-	+	-		
	10	-	-	-	+		
	ацетон	-	-	-	-		
Сумма НЖК	0,1	-	+	-	-	1,00	0,45
	1	-	-	+	-		
	10	-	-	-	+		
	ацетон	-	-	-	-		
Сумма МНЖК	0,1	+	+	-	+	37,3	5,6·10 ⁻³
	1	+	-	+	+		
	10	-	+	+	+		
	ацетон	-	+	+	-		
Сумма ПНЖК	0,1	+	+	-	+	65,5	3,9·10 ⁻⁷
	1	+	-	+	+		
	10	-	+	+	+		
	ацетон	-	+	+	-		

Примечание: «+» — значимые отличия ($\alpha = 0,05$; $n = 3$); «-» — отсутствие значимых отличий ($\alpha = 0,05$; $n = 3$); F — критерий Фишера; p — вероятность. Жирным шрифтом выделены компоненты, имеющие статистически значимые отличия.

Note: “+” indicates significant differences ($\alpha = 0.05$; $n = 3$); “-” indicates lack of significant differences ($\alpha = 0.05$; $n = 3$); F indicates Fisher’s F-test; p indicates probability. The components with significant differences are in bold.

Установлено, что в липидах трохофор *M. galloprovincialis* достоверно отличаются значения суммы мононенасыщенных жирных кислот (далее — МНЖК) и полиненасыщенных жирных кислот (далее — ПНЖК). Сумма насыщенных жирных кислот (далее — НЖК) статистически не меняется. Основными НЖК являлись пальмитиновая (С16:0) (35–39 %) и стеариновая (С18:0) (8–14 %) кислоты. Концентрация насыщенных кислот с числом углеродных атомов 14 и 15 составляла 4–7 %. Сравнительно высокий уровень НЖК в трохофорах связан с высокой метаболической активностью у моллюсков в нерестовый весенний период [30]. Например, при изучении сезонного состава жирных кислот жемчужной устрицы *Pinctada fucata martensii* определено, что основную часть насыщенных жирных кислот составляли миристиновая (С14:0), пальмитиновая (С16:0) и стеариновая (С18:0). Миристиновая (С14:0) кислота у животных редко выступает в качестве основного компонента. В наших исследованиях её концентрация изменялась в диапазоне 5,7–7,7 %.

Наиболее распространённые МНЖК представлены пальмитолеиновой (C16:1 ω 7), олеиновой (C18:1 ω 9) и вакценовой (C18:1 ω 7) кислотами. Пальмитолеиновая (C16:1 ω 7) и олеиновая (C18:1 ω 9) кислоты образуются из пальмитиновой (C16:0) и стеариновой (C18:0) [14]. Вакценовая (C18:1 ω 7) кислота является изомером олеиновой (C18:1 ω 9), которая синтезируется в животных клетках (эндоплазматический ретикулум и митохондрии) из стеариновой (C18:0) кислоты путём образования двойной связи. Наличие в пробах трохофор *цис*-вакценовой (C18:1 ω 7) кислоты, которая в основном характерна для анаэробных бактерий [18], указывает на нестерильные условия проведения эксперимента.

Мононенасыщенная олеиновая (*цис*-9-октадеценовая) (C18:1 ω 9) кислота, обнаруженная нами в трохофорах мидий, имеет два возможных происхождения — экзогенное (из-за употребления диатомовых водорослей мидиями) и эндогенное (через превращения пальмитиновой (C16:0) и стеариновой (C18:0) кислот) [20]. Повышенное содержание незаменимой олеиновой (C18:1 ω 9) кислоты в трохофорах моллюсков может быть связано с её дополнительным синтезом под токсическим воздействием загрязняющих веществ с целью связывания и детоксикации ксенобиотиков [22]. Увеличение уровня изомеров октадеценовых (C18:1) кислот может свидетельствовать об усиленном метаболизме в клетках личинок [14].

В липидах трохофор идентифицированы следующие полиненасыщенные жирные кислоты: арахидоновая (C20:4 ω 6), эйкозапентаеновая (C20:5 ω 3) и докозагексаеновая (C22:6 ω 3). Суммарное содержание Омега-3 и Омега-6 кислот в личинках мидий контрольного опыта не превышало 12,8 %. Концентрация незаменимой арахидоновой (C20:4 ω 6) кислоты в трохофорах не являлась постоянной величиной и варьировала в широком диапазоне от 1 до 21 %. Для сравнения: в гастроподах концентрация арахидоновой (C20:4 ω 6) кислоты достигала 5,73 % [25]. Как известно, живые организмы могут синтезировать арахидоновую (C20:4 ω 6) кислоту из незаменимой Омега-6-ненасыщенной линолевой кислоты [1]. Биосинтез линолевой (C18:2 ω 6) кислоты может осуществляться только в растениях. Далее она по пищевым цепям передаётся животным. Так как в личинках мидии линолевая (C18:2 ω 6) кислота обнаружена нами практически в каждой пробе, можно предположить, что она необходима для биосинтеза арахидоновой (C20:4 ω 6) кислоты на дальнейших стадиях развития моллюсков. Арахидоновая (C20:4 ω 6) кислота также является основным компонентом мембранных фосфолипидов у животных. Кроме того, она нужна для биосинтеза простагландинов [29]. Вероятно, более высокие уровни этой жирной кислоты в трохофорах связаны с синтезом простагландинов в мидиях [21].

ПНЖК участвуют в адаптации организма к окружающей среде [14]. Большинство беспозвоночных не способны синтезировать ПНЖК и получают их с пищей, обеспечивая таким образом свои потребности в этих эссенциальных компонентах для поддержания нормального функционирования организма [28]. Например, докозагексаеновая (C22:6 ω 3) кислота может влиять на активность Na⁺/K⁺-АТФазы — фермента клеточных мембран, который избирательно выкачивает из клетки ионы натрия и аккумулирует в ней ионы калия. Создаваемая ферментом разница концентраций одновалентных катионов имеет большое значение для протекания ключевых реакций жизнедеятельности — генерации нервного возбуждения, водно-солевого обмена — и для регуляции клеточного метаболизма [26]. В нашем исследовании содержание эйкозапентаеновой (C20:5 ω 3) кислоты во всех образцах не превышало 4,5 %, а докозагексаеновой (C22:6 ω 3) — 3,1 %. Эйкозапентаеновую (C20:5 ω 3) и докозагексаеновую (C22:6 ω 3) кислоты продуцирует фитопланктон [27 ; 29 ; 30], и низкие их уровни объясняются, скорее всего, эндогенным питанием личинок на стадии трохофоры.

Известно, что загрязнённость среды ПХБ оказывает влияние на состав жирных кислот [14]. Наши эксперименты показали, что суммарное содержание НЖК в личинках, подверженных влиянию ПХБ, изменялось в достаточно узком интервале — от 52,2 до 65,3 %. Накопление этих кислот указывает на их участие в поддержании целостности структуры мембран [14]. Наименьшее

содержание стеариновой (C18:0) кислоты в личинках отмечено при воздействии 0,1 мкг·л⁻¹ ПХБ. Под действием 1 и 10 мкг·л⁻¹ ПХБ концентрации стеариновой (C18:0) кислоты практически не отличались, но становились ниже, чем в контрольном образце и в пробе с ацетоном. Этот факт говорит о том, что реакция личинок на появление в среде ПХБ проявилась в снижении проницаемости плазматических мембран, что могло уменьшить токсическое влияние ПХБ.

Содержание МНЖК снижалось примерно в 2 раза относительно контроля при концентрациях ПХБ 0,1 и 1 мкг·л⁻¹, в то время как содержание ПНЖК увеличивалось примерно в 2,5–3 раза при концентрациях ПХБ 1 и 0,1 мкг·л⁻¹ и в 1,3 раза — при концентрации ПХБ 10 мкг·л⁻¹.

При невысоком содержании ПХБ — 0,1 и 1 мкг·л⁻¹ — концентрация кислот (C18:1) уменьшалась по сравнению с таковой в контрольном опыте более чем в два раза, а при 10 мкг·л⁻¹ их содержание было равно таковому в контроле. Возможно, при невысоких концентрациях ПХБ изменение содержания МНЖК вызвано действием нескольких каталитических механизмов, включающих механизмы перекисного окисления, в дополнение к цитохром Р450 монооксигеназному пути. Ферменты системы цитохром Р450 гидроксилируют связи С-Н субстратов, катализируют омега-окисление насыщенных жирных кислот и перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот [14]. До закладки пищеварительных органов трохофоры находятся на эндогенном питании, при этом жирные кислоты используются в основном для формирования биомембран и запасных липидов [14 ; 16 ; 17 ; 25].

Изменение долей МНЖК и ПНЖК при почти неизменной доле НЖК под действием полихлорбифенилов связано с защитной функцией НЖК в организме личинок. Этот факт объясняется тем, что синтез ненасыщенных жирных кислот происходит из НЖК. ПНЖК, например, имеют более низкие точки плавления, чем насыщенные кислоты, и образуют более рыхлую структуру липидного бислоя. Увеличение текучести биологических мембран и высокая метаболическая активность мембранных ферментов обусловлены ассиметричным строением и температурой плавления полиенов [14]. Действие поллютантов может прямо, особенно на ранней стадии онтогенеза, или опосредовано, через изменения вещественно-энергетических потоков в экосистеме, повлиять на резистентность и толерантность культивируемых организмов к условиям среды выращивания [2].

Увеличение концентрации арахидоновой (C20:4 ω 6) кислоты с 1,3 % в контроле до 20,5 % при воздействии 0,1 мкг·л⁻¹ ПХБ также объясняется её способностью выступать в качестве гормона, активируя рецепторы клеток и играя при этом важную роль в иммунном ответе. При более высоких концентрациях ПХБ (1 и 10 мкг·л⁻¹) содержание арахидоновой (C20:4 ω 6) кислоты снижается, что свидетельствует о её интенсивном использовании в ферментативных процессах [14].

Заключение. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что тип и состав жирных кислот в трохофорах мидий изменялись при различной загрязнённости среды их обитания ПХБ. Содержание насыщенных жирных кислот, например стеариновой (C18:0), и изомеров октадеценовых (C18:1) кислот резко снижалось при воздействии даже 0,1 мкг·л⁻¹ ПХБ, хотя суммарное содержание НЖК практически не изменялось при концентрациях ПХБ от 0 до 10 мкг·л⁻¹, а содержание изомеров октадеценовых (C18:1) кислот возрастало почти в 3 раза при увеличении концентрации ПХБ до 10 мкг·л⁻¹. Такая тенденция связана с особенностями строения как клеточных мембран личинок, так и молекул НЖК и МНЖК. Содержание ПНЖК, например арахидоновой (C20:4 ω 6) кислоты, напротив, увеличивалось при действии 0,1 мкг·л⁻¹ ПХБ, что связано, возможно, с её способностью выступать в качестве гормона в иммунном ответе.

Результаты работы могут быть использованы в управлении продукционными процессами в хозяйствах по культивированию моллюсков. Изучение дозозависимого влияния ПХБ на соотношение НЖК, МНЖК и ПНЖК в тканях личинок мидий может способствовать лучшему пониманию биохимических перестроек, позволяющих моллюскам адаптироваться к действию неблагоприятных факторов среды.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по темам «Фундаментальные исследования популяционной биологии морских животных, их морфологического и генетического разнообразия» (№ гос. регистрации АААА-А19-119060690014-5), «Молисммологические и биогеохимические основы гомеостаза морских экосистем» (№ АААА-А18-118020890090-2) и «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса» (№ АААА-А18-118021350003-6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Гаврисюк В. К. Применение Омега-3 полиненасыщенных жирных кислот в медицине // *Український пульмонологічний журнал*. 2001. № 3. С. 5–10. [Gavrisyuk V. K. Primenenie Omega-3 polinenasyshchennykh zhirnykh kislot v meditsine. *Ukrainskyi pulmonologichnyi zhurnal*, 2001, no. 3, pp. 5–10. (in Russ.)]
2. Золотницкий А. П. Современное состояние, проблемы и перспективы развития конхиокультуры в Украине // *Рибне господарство України*. 2011. № 4. С. 45–48. [Zolotnitskii A. P. Sovremennoe sostoyanie, problemy i perspektivy razvitiya konkhiokul'tury v Ukraine. *Rybne hospodarstvo Ukrainy*, 2011, no. 4, pp. 45–48. (in Russ.)]
3. Караванцева Н. В., Поспелова Н. В., Бобко Н. И., Нехорошев М. В. Методика отбора половых продуктов мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. // *Системы контроля окружающей среды*. 2012. № 17. С. 184–187. [Karavantseva N. V., Pospelova N. V., Bobko N. I., Nekhoroshev M. V. Technique for collection of mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. gametes. *Sistemy kontrolya okruzhayushchei sredy*, 2012, no. 17, pp. 184–187. (in Russ.)]
4. Кейтс М. *Техника липидологии*. Москва : Изд-во «Мир», 1975. 324 с. [Kates M. *Tekhnika lipidologii*. Moscow : Izd-vo "Mir", 1975, 324 p. (in Russ.)]
5. Котелевцев С. В., Маторин Д. Н., Садчиков А. П. *Экологическая токсикология и биотестирование водных экосистем* : учебное пособие. Москва : Изд-во «Инфра-М», 2015. 252 с. [Kotelevtsev S. V., Matorin D. N., Sadchikov A. P. *Ekologicheskaya toksikologiya i biotestirovanie vodnykh ekosistem* : uchebnoe posobie. Moscow : Izd-vo "Infra-M", 2015, 252 p. (in Russ.)]
6. Малахова Л. В., Малахова Т. В., Щурова Е. С., Карамышев А. К. Мониторинг хлорорганического загрязнения Севастопольской акватории с использованием мидий *M. galloprovincialis* в качестве вида-индикатора // *Морские биологические исследования: достижения и перспективы* : в 3-х т. : сб. материалов Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, приуроч. к 145-летию Севастопольской биологической станции, Севастополь, 19–24 сент. 2016 г. / под общ. ред. А. В. Гаевской. Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2016. Т. 3. С. 140–143. [Malakhova L. V., Malakhova T. V., Shchurova E. S., Karamyshev A. K. Monitoring khlororganicheskogo zagryazneniya Sevastopol'skoi akvatorii s ispol'zovaniem midii *M. galloprovincialis* v kachestve vida-indikatora. In: *Morskie biologicheskie issledovaniya: dostizheniya i perspektivy* : v 3-kh t. : sb. materialov Vseros. nauch.-prakt. konf. s mezhdunar. uchastiem, priuroch. k 145-letiyu Sevastopol'skoi biologicheskoi stantsii, Sevastopol, 19–24 Sept., 2016 / A. V. Gaevskaya (Ed.). Sevastopol : EKOSI-Gidrofizika, 2016, vol. 3, pp. 140–143. (in Russ.)]
7. Никонова Л. Л., Малахова Л. В., Нехорошев М. В., Рябушко В. И. Хлорорганические соединения в гонадах и половых продуктах двустворчатого моллюска мидии *M. galloprovincialis* Lam., 1819, культивируемого у берегов Крыма (Черное море) // *Вода: химия и экология*. 2017. № 3. С. 40–45. [Nikonova L. L., Malakhova L. V., Nekhoroshev M. V., Ryabushko V. I. Organochlorine compounds in gonads and gametes of bivalve mollusk *M. galloprovincialis* Lam., cultivated near the shores of the Crimea (the Black Sea). *Voda: khimiya i ekologiya*, 2017, no. 3, pp. 40–45. (in Russ.)]
8. Пиркова А. В., Ладыгина Л. В., Бобко Н. И. Воздействие загрязняющих веществ в морской воде на развитие личинок мидии *M. galloprovincialis* Lam. и устрицы *Crassostrea gigas* // *Водные биоресурсы, аквакультура и экология водоемов* : материалы Всерос. науч. конф., г. Калининград, 23–24 мая 2017 г. Калининград : ФГБОУ ВО «КГТУ», 2017. С. 135–138. [Pirkova A. V., Ladygina L. V., Bobko N. I. Vozdeistvie zagryaznyayushchikh veshchestv v morskoi vode na razvitie lichinok midii *M. galloprovincialis* Lam. i ustritsy *Crassostrea gigas*.

- In: *Vodnye bioresursy, akvakul'tura i ekologiya vodoemov* : materialy Vseros. nauch. konf., Kaliningrad, 23–24 May, 2017. Kaliningrad : FGBOU VO "KGTU", 2017, pp. 135–138. (in Russ.)]
9. Пиркова А. В., Ладыгина Л. В., Бобко Н. И. Эмбрионы мидии *M. galloprovincialis* Lam. – индикаторы загрязнения морской воды поверхностно-активными веществами // *Загрязнение морской среды: экологический мониторинг, биоиндикация, нормирование* : материалы Всерос. науч. конф., г. Севастополь, 28 мая – 01 июня 2018 г. Севастополь : ООО «Колорит», 2018. С. 205–209. [Pirkova A. V., Ladygina L. V., Bobko N. I. Embryony midii *M. galloprovincialis* Lam. – indikatory zagryazneniya morskoi vody poverkhnostno-aktivnymi veshchestvami. In: *Zagryaznenie morskoi sredy: ekologicheskii monitoring, bioindikatsiya, normirovanie* : materialy Vseros. nauch. konf., Sevastopol, 28 May – 01 June, 2018. Sevastopol : ООО "Kolorit", 2018, pp. 205–209. (in Russ.)]
 10. ПНД Ф 14.1:2:3:4.204-04 *Методика измерений массовых концентраций хлорорганических пестицидов и полихлорированных бифенилов в пробах питьевых, природных и сточных вод методом газовой хроматографии* (издание 2018 г.). Утверждена директором ФГБУ «Федеральный центр анализа и оценки техногенного воздействия» В. Ч. Юранец 31 июля 2018 г. [PND F 14.1:2:3:4.204-04 *Metodika izmerenii massovykh kontsentratsii khlororganicheskikh pestitsidov i polikhlorirovannykh bifenilov v probakh pit'evykh, prirodnykh i stochnykh vod metodom gazovoi khromatografii* (izdanie 2018 g.). Utverzhdena direktorom FGBU "Federal'nyi tsentr analiza i otsenki tekhnogenogo vozdeistviya" V. Ch. Yuranets 31.07.2018 (in Russ.)]
 11. Поспелова Н. В., Егоров В. Н., Челядина Н. С., Нехорошев М. В. Содержание меди в органах и тканях *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 и поток её седиментационного депонирования в донные осадки в хозяйствах черноморской аквакультуры // *Морской биологический журнал*. 2018. Т. 3, № 4. С. 64–75. [Pospelova N. V., Egorov V. N., Chelyadina N. S., Nekhoroshev M. V. The copper content in the organs and tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 and the flow of its sedimentary deposition into bottom sediments in the farms of the Black Sea aquaculture. *Morskoy biologicheskij zhurnal*, 2018, vol. 3, no. 4, pp. 64–75. (in Russ.)].
<https://doi.org/10.21072/mbj.2018.03.4.07>
 12. Рябушко В. И., Козинцев А. Ф., Тоичкин А. М. Концентрация мышьяка в тканях культивируемой мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam., в воде и донных осадках (Крым, Чёрное море) // *Морской биологический журнал*. 2017. Т. 2, № 3. С. 68–74. [Ryabushko V. I., Kozintsev A. F., Toichkin A. M. Concentration of arsenic in the tissues of cultivated mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam., water and bottom sediments (Crimea, Black Sea). *Morskoy biologicheskij zhurnal*, 2017, vol. 2, no. 3, pp. 68–74. (in Russ.)].
<https://doi.org/10.21072/mbj.2017.02.3.06>
 13. ТС Т. Р. 021/2011. *Технический регламент Таможенного союза о безопасности пищевой продукции*. Москва : Госстандарт России, 2011. 242 с. [TS T. R. 021/2011. *Tekhnicheskii reglament Tamozhennogo soyuza o bezopasnosti pishchevoi produktsii*. Moscow : Gosstandart Rossii, 2011, 242 p. (in Russ.)]
 14. Фокина Н. Н., Нефедова З. А., Немова Н. Н. *Липидный состав мидий *Mytilus edulis* L. Белого моря. Влияние некоторых факторов среды обитания*. Петрозаводск : Изд-во КарНЦ РАН, 2010. 243 с. [Fokina N. N., Nefedova Z. A., Nemova N. N. *Lipidnyi sostav midii *Mytilus edulis* L. Belogo morya. Vliyanie nekotorykh faktorov sredy obitaniya*. Petrozavodsk : Izd-vo KarNTs RAN, 2010, 243 p. (in Russ.)]. <http://doi.org/10.13140/2.1.2154.8322>
 15. Хасанов В. В., Рыжова Г. Л., Дычко К. А., Куряева Т. Т. Состав жирных кислот и стероидов растительных масел // *Химия растительного сырья*. 2006. № 3. С. 27–31. [Khasanov V. V., Ryzhova G. L., Dychko K. A., Kuryaeva T. T. Sostav zhirnykh kislot i steroidov rastitel'nykh masel. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2006, no. 3, pp. 27–31. (in Russ.)]
 16. Холодов В. И., Пиркова А. В., Ладыгина Л. В. *Выращивание мидий и устриц в Черном море*. Воронеж : Изд-во ООО «Издат-Принт», 2017. 508 с. [Kholodov V. I., Pirkova A. V., Ladygina L. V. *Cultivation of Mussels and Oysters in the Black Sea*. Voronezh : Izd-vo ООО "Izdat-Print", 2017, 508 p. (in Russ.)]. <https://repository.marine-research.org/handle/299011/5523>
 17. Чеботарева М. А., Забелинский С. А., Шуколокова Е. П., Кривченко А. И. Предел изменения индекса ненасыщенности жирнокислотного состава фосфолипидов при адаптациях моллюсков к биогенным и абиогенным факторам внешней среды // *Журнал эволюционной*

- биохимии и физиологии. 2011. Т. 47, № 5. С. 383–387. [Chebotareva M. A., Zabelinskii S. A., Shukolyukova E. P., Krivchenko A. I. Limit of change in unsaturation index of fatty acid composition of phospholipids at adaptation of molluscs to biogenic and abiogenic environmental factors. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 2011, vol. 47, no. 5, pp. 448–453. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.1134/S0022093011050069>
18. Cronan J. E., Thomas J. Bacterial fatty acid synthesis and its relationships with polyketide synthetic pathways. *Methods in Enzymology*, 2009, vol. 459, pp. 395–433. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)04617-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)04617-5)
 19. Egorov V. N., Lazorenko G. E., Mirzoeva N. Yu., Stokozov N. A., Kostova S. K., Malakhova L. V., Pirkova A. V., Arkhipova S. I., Korkishko N. F., Popovichev V. N., Plotitsyna O. V., Migal L. V. Content of ^{137}Cs , ^{40}K , ^{90}Sr , radionuclides, and some chemical pollutants in the Black Sea mussels *M. galloprovincialis* Lam. *Morskoj ekologicheskij zhurnal*, 2006, vol. 5, no. 3, pp. 70–78.
 20. Ekin I., Bařhan M. Fatty acid composition of selected tissues of *Unio elongatulus* (Bourguignat, 1860) (Mollusca: Bivalvia) collected from Tigris River, Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2010, vol. 1, no. 4, pp. 445–451. <https://doi.org/10.4194/trjfas.2010.0402>
 21. Ekin I., řeřen R. Investigation of the fatty acid contents of edible snails *Helix lucorum*, *Eobania vermiculata* and non-edible slug *Limax flavus*. *Records of Natural Products*, 2017, vol. 11, no. 6, pp. 562–567. <https://doi.org/10.25135/acg.rnp.72.17.02.043>
 22. Fokina N. N., Ruokolainen T. R., Nemova N. N. Lipid composition modifications in the blue mussels (*Mytilus edulis* L.) from the White Sea. In: *Organismal and Molecular Malacology* / R. Bettencourt et al. (Eds). Intech, 2017, chap. 7, pp. 143–159. <https://doi.org/10.5772/67811>
 23. Klimova T. N., Vdodovich I. V., Zagorodnyaya Yu. A., Ignatyev S. M., Malakhova L. V., Dotsenko V. S. Ichthyoplankton in the plankton community of the Crimean Peninsula shelf zone (Black Sea) in July 2010. *Journal of Ichthyology*, 2014, vol. 54, no. 6, pp. 409–421. <https://doi.org/10.1134/S0032945214030060>
 24. Leonardos N., Lucas I. The use of larval fatty acids as an index of growth in *Mytilus edulis* L. larvae. *Aquaculture*, 2000, vol. 184, pp. 155–166. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00320-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00320-8)
 25. Leroy F., Meziane T., Riera P., Comtet T. Seasonal variations in maternal provisioning of *Crepidula fornicata* (Gastropoda): Fatty acid composition of females, embryos and larvae. *PLoS One*, 2013, no. 8, pp. 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075316>
 26. Nagy K., Tiuca I.-D. Importance of fatty acids in physiopathology of human body. In: *Fatty Acids* / A. Catala (Ed.). Intech, 2017, chap. 1, pp. 1–22. <https://doi.org/10.5772/67407>
 27. Nelson M. M., Leighton D. L., Phleger C. F., Nichols P. D. Comparison of growth and lipid composition in the green abalone, *Haliotis fulgens*, provided specific macroalgal diets. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, vol. 131, no. 73, pp. 695–712. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(02\)00042-8](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00042-8)
 28. Peters J. Role of essential fatty acids on the reproductive success of the copepod *Temora longicornis* in the North Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 2007, vol. 341, pp. 153–163. <https://doi.org/10.3354/meps341153>
 29. Pettersen A. K., Turchini G. M., Jahangard S., Ingram B. A., Sherman C. D. Effects of different dietary microalgae on survival, growth, settlement, and fatty acid composition of blue mussel (*M. galloprovincialis*) larvae. *Aquaculture*, 2010, vol. 309, pp. 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.024>
 30. Saito H. Lipid and FA composition of the pearl *Oyster pinctada*. *Lipids*, 2004, vol. 39, no. 10, pp. 997–1005. <https://doi.org/10.1007/s11745-004-1322-3>
 31. Weis J. S. Delayed behavioral effects of early life toxicant exposures in aquatic biota. *Toxics*, 2014, vol. 2, no. 2, pp. 165–187. <https://doi.org/10.3390/toxics2020165>

**FATTY ACID COMPOSITION
IN TROCHOPHORES OF MUSSEL *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*
GROWN UNDER CONTAMINATION WITH POLYCHLORINATED BIPHENYLS**

L. L. Kapranova, L. V. Malakhova, M. V. Nekhoroshev, V. V. Lobko, and V. I. Ryabushko

A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation
E-mail: lar_sa1980@mail.ru

Status of *Mytilus galloprovincialis* populations in the natural habitat is known to directly depend on development of Black Sea mussel at all its stages, including initial stages of larval ontogenesis, which are very sensitive to environmental pollution. Organic pollutants adversely affect mussel larvae by inhibiting their growth and development. Patterns of mussel reproduction are well studied, which makes it possible to obtain larvae from artificially fertilized eggs of this mollusc species in controlled laboratory conditions. In this work, the fatty acid composition of *M. galloprovincialis* larvae at the trochophore stage on the 3rd day in the control experiment and under artificial contamination with polychlorinated biphenyls (PCBs) in different concentrations is studied for the first time. The fatty acid composition of total lipids in the biomass of larvae obtained on the 3rd day of the experiment was studied by means of gas chromatography – mass spectrometry. Totally, 14 fatty acids were identified in the samples; 59 % of them were saturated fatty acids, 24 % were monounsaturated fatty acids, and 17 % were polyunsaturated fatty acids. Statistical analysis was performed using Statistical Toolbox of MATLAB software (version 8.2). The totals of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids significantly differed in lipids of *M. galloprovincialis* trochophores in the experiment with different PCB concentrations. The totals of saturated fatty acids did not significantly differ. The major saturated fatty acids in all mussel trochophores studied were palmitic (C16:0) and stearic (C18:0) acids. Their concentration did not significantly change under the exposure to PCBs. The main monounsaturated fatty acids were oleic (C18:1 ω 9), palmitoleic (C16:1 ω 7), and vaccenic (C18:1 ω 7) acids. The fraction of monounsaturated fatty acids was twice as low when exposed to the PCB concentrations 0.1 and 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. However, when the PCB concentration was 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, the total of these acids did not differ from the control. Among polyunsaturated fatty acids having biological essentiality, it was possible to identify arachidonic (C20:4 ω 6), eicosapentaenoic (C20:5 ω 3), and docosahexaenoic (C22:6 ω 3) acids. The total fraction of omega-3 and omega-6 acids in mussel larvae in the control did not exceed 12.8 %. With an increase of the PCB concentration in the growth medium 0.1 to 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, the fraction of polyunsaturated fatty acids increased 2.5-fold. At the PCB concentration 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and in the sample with pure acetone added, the total fraction of polyunsaturated fatty acids was comparable with that in the control. The results of the study indicate that fatty acid response is the highest when the medium is exposed to the PCB concentrations ranging 0.1 to 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. At the PCB concentrations equal to 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ or higher, biochemical processes in larvae seem to slow down. The results of this study will contribute to a better understanding of biochemical rearrangements that allow molluscs at larval developmental stages to adapt to environmental pollution with organic xenobiotics.

Keywords: polychlorinated biphenyls, fatty acids, larvae, trochophore, mussel *Mytilus galloprovincialis*, Black Sea

УДК 593.1:591.1

ДЕЙСТВИЕ ПРЯМОУГОЛЬНЫХ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ИМПУЛЬСОВ НИЗКОЙ ЧАСТОТЫ НА ТРИХОПЛАКСА (ТИП PLASOZOA)

© 2020 г. А. В. Кузнецов^{1,3}, О. Н. Кулешова¹, А. Ю. Пронозин²,
О. В. Кривенко¹, О. С. Завьялова³

¹Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,
Севастополь, Российская Федерация

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Российская Федерация

³Севастопольский государственный университет, Севастополь, Российская Федерация

E-mail: kuznet61@gmail.com

Поступила в редакцию 24.09.2019; после доработки 25.03.2020;
принята к публикации 26.06.2020; опубликована онлайн 30.06.2020.

Влияние низкочастотного электромагнитного излучения (НЭМИ) на растения и животных, включая человека, достаточно спорно. Мало известно и о воздействии НЭМИ на гидробионтов. Мы изучили действие прямоугольных импульсов напряжения различной амплитуды, длительности и скважности, пропущенных через морскую воду, на трихопласа (тип Placozoa) как на возможную тестовую лабораторную модель. В опытах использовали три штамма Placozoa, *Trichoplax adhaerens* (Н1), *Trichoplax* sp. (Н2) и *Hoilungia hongkongensis* (Н13), отобранных на стационарной стадии роста культуры. Для генерации последовательности прямоугольных импульсов заданной длительности и скважности с частотой до 2 кГц применяли аппаратную платформу Arduino Uno. Среднее значение напряжения до 500 мВ регулировали с помощью схемы делителя напряжения. Для доказательства специфичности действия электрических импульсов на потенциалзависимые кальциевые каналы трихопласа использовали ингибитор активности кальциевых каналов амлодипин. Животных стимулировали электрическим током под стереомикроскопом. Электроды располагали в непосредственной близости от животного. Исследовали сопутствующие изменения поведения и морфологии пластинки трихопласа. Выделяли стимулирующие и подавляющие воздействия. Наблюдения документировали с помощью фото- и видеосъёмки. Отслеживали траектории движения отдельных особей. Увеличение напряжения на электродах при фиксированной частоте 20 Гц приводило к тому, что животные штамма Н2 покидали «зону электродов» в течение нескольких минут при 25 мВ, однако теряли подвижность пропорционально росту напряжения и обездвиживались при 500 мВ. Именно поэтому в дальнейших опытах применяли напряжение 50 мВ. В экспериментах с двумя электродами, находящимися с одной стороны трихопласа, у животного было больше возможностей перемещаться в разных направлениях, чем в случае расположения электродов по обеим сторонам пластинки. Направление движения использовали как характеристический признак. Отмечено, что трихопласы мигрируют в области с низкой плотностью линий электрического поля, которые расположены вдали или за электродами. Животные из старой культуры отличались меньшей чувствительностью к электрическому раздражителю. Штамм Н2 был наиболее чувствительным и демонстрировал более выраженные физиологические реакции на частотах 2 Гц и 2 кГц с напряжением 50 мВ, чем штамм Н1 и особенно штамм Н13. В зависимости от длительности стимулирующих прямоугольных импульсов, их числа, амплитуды и варьирующей частоты менялись двигательные реакции и морфология животных: от направленной или стохастической миграции в сторону анода/катода или от него до обездвиживания животных, увеличения оптической плотности по периферии и в центре пластинки и до сворачивания трихопласа и отделения его от субстрата. В дополнительных опытах на *Trichoplax* sp.

Н2 показано, что при длительности импульсов 35 мс и задержке импульсов от 1 мс до 10 с доля обездвиженных животных увеличивается до 80 % при минимальной задержке. Тем не менее в случае применения амлодипина в концентрации 25 нМ практически все трихоплаксы в течение нескольких минут сохраняли подвижность несмотря на обработку электрическими импульсами. Между тем при использовании амлодипина в концентрации 250 нМ животные двигались дискоординированно и не могли покинуть «электродную ловушку». Далее пластинка трихоплакса становилась ригидной, что выражалось в неизменности формы животного при движении. Наконец, амлодипин в концентрации 50 мкМ вызывал быстрое сворачивание краёв трихоплакса в розетку в вентрально-дорсальном направлении и последующую диссоциацию пластинки на отдельные клетки. В целом применяемое электрическое воздействие имело кумулятивный, но обратимый эффект, который, как предполагается, может быть связан с работой потенциалзависимых кальциевых каналов. Амлодипин в большой концентрации (50 мкМ) вызывал разрушение трихоплакса, в умеренной (250 нМ) он нарушал, вероятно, распространение волн активации, что приводило к дискоординации движений животного, а в малой (25 нМ) предотвращал электрошок.

Ключевые слова: прямоугольные электрические импульсы, трихоплакс, пластинчатые, потенциалзависимые кальциевые каналы

Электромагнитное излучение в диапазоне от единиц до нескольких тысяч Гц не оказывает прямого теплового воздействия на живую ткань, а действует опосредованно через определённые клеточные механизмы и вызывает соответствующие физиологические эффекты [18 ; 29]. Обнаружено, что низкочастотные электромагнитные излучения (далее — НЭМИ; extremely low frequency electric and magnetic fields, ELF-EMF) могут индуцировать экспрессию генов [41 ; 48] и вызывать пролиферацию клеток [43]. Лабораторные исследования показали, что НЭМИ влияют на клеточные мембраны и ионные каналы [22], в особенности на потенциалзависимые кальциевые каналы [12].

Интересно, что блокаторы кальциевых каналов значительно снижают различные эффекты НЭМИ [26]. Кроме того, биофизические свойства потенциалзависимых каналов могут объяснить молекулярные механизмы биологических эффектов НЭМИ. Например, нисходящий регуляторный клеточный ответ на такие воздействия может быть опосредован через Ca^{2+} /кальмодулин стимуляцию синтеза оксида азота (NO), физиологические реакции могут быть результатом стимуляции NO-зависимой сGMP-протеинкиназы G, а патофизиологические процессы — следствием NO-пероксинитрит-окислительного стресса. Описаны и другие опосредованные Ca^{2+} регуляторные пути, которые не зависят от оксида азота [11 ; 16 ; 25].

Существует несколько типов кальциевых каналов: высокопороговые каналы, с промежуточным порогом активации, низкопороговые [27]. Кальциевые каналы L-, P- и N-типов активируются при высоких значениях мембранного потенциала. К каналам L-типа принадлежат четыре протеина с множеством изоформ $Ca_v1.1$ – $Ca_v1.4$, кодирующиеся у человека генами *CACNA1S*, *CACNA1C*, *CACNA1D* и *CACNA1F*; они экспрессируются главным образом в скелетных мышцах и отвечают за сокращение сердечной и гладких мышц [21]. Каналы P- и N-типов представлены в нейронах белками $Ca_v2.1$ и $Ca_v2.2$ соответственно; они отвечают за высвобождение нейромедиаторов. К кальциевым каналам R-типа с промежуточным порогом активации относится протеин $Ca_v2.3$ [24 ; 35]. Низкопороговые кальциевые каналы принадлежат к T-типу. Ими обладают клетки с пейсмекерной активностью, напримерводители ритма сердца человека [5]. Эти каналы представлены белками $Ca_v3.1$ – $Ca_v3.3$ и кодируются генами *CACNA1G*, *CACNA1H* и *CACNA1I* соответственно [46]. Очевидная роль Ca_v3 -каналов T-типа проявляется в клеточной возбудимости, где их низкие напряжения активации позволяют легко осуществить деполяризацию мембраны. Также каналы T-типа играют роль в запуске механизма экзоцитоза у позвоночных и беспозвоночных [32 ; 45]. Ca_v3 -каналы присутствуют у примитивных животных и в одноклеточных организмах [23 ; 40].

Полезной моделью для изучения эффектов НЭМИ могут быть представители типа Placozoa, в частности *Trichoplax adhaerens* [30]. Трихоплакс имеет тело неправильной формы (размер — около 1 мм); оно сформировано двумя слоями эпителия, между которыми находится рыхлый

клеточный слой. Это крошечное морское животное построено из шести основных типов клеток [7 ; 39]. После первоначального описания, сделанного Ф. Э. Шульце в 1883 г. [31], трихоплакс вызвал интерес с точки зрения минимальных требований к метазою. Отсутствие симметрии органов, нервных и мышечных клеток, базальной пластинки и внеклеточного матрикса не оставляло сомнений в древности происхождения этого животного. Однако, несмотря на примитивное строение, трихоплаксы способны координировать двигательную активность при кормлении [37] и демонстрировать хемотаксис [13], подтверждая существование сложных механизмов межклеточного взаимодействия и интеграции. Обнаружены быстрые ритмические сокращения дорсального эпителия трихоплакса [2] и предложена модель движения животного, основанная на диаграммах Вороного [38]. Структура, функция и ионная селективность одиночного кальциевого канала Т-типа из трихоплакса (TCa_v3) были охарактеризованы с помощью методики patch-clamp после его клонирования в эмбриональных клетках почки человека линии НЕК-293Т [36]. С учётом того, что Ca_v -каналы играют решающую роль как во внутриклеточной, так и в межклеточной передаче сигналов [23], и того, что трихоплакс имеет в своём геноме полный набор генов Ca_v1 , Ca_v2 и Ca_v3 , кодирующих Ca_v -каналы [15 ; 40], появилась возможность изучения молекулярных мишеней и механизмов, лежащих в основе эффектов НЭМИ на многоклеточные организмы.

Целью данной работы было изучить реакцию трихоплаксов на последовательности п-образных электрических импульсов, имитирующих воздействия, необходимые для открывания кальциевых каналов *in vivo*. Импульсы прямоугольной формы выбраны для воздействия на трихоплаксов потому, что они вызывают большее раздражение у биологических объектов, чем колебания любых других форм. Мы также сочли уместным использовать прямоугольные импульсы как идеализированную, «дискретную» модель электромагнитного излучения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Культивирование. В работе использовали три штамма Placozoa, такие как *Trichoplax adhaerens* (гаплотип Н1), *Trichoplax* sp. Н2 (гаплотип Н2) и *Hoilungia hongkongensis* (гаплотип Н13), из которых последний штамм можно отнести к отдельному виду [8 ; 9]. Животных культивировали в стеклянных чашках Петри диаметром 90 см на матах одноклеточной зелёной водоросли *Tetraselmis marina* в искусственной морской воде (ASW, Red Sea Salt, Red Sea Fish Pharm LTD, Израиль) с солёностью 35 ‰ при температуре +25 °С по стандартному протоколу [17]. Морскую воду меняли не реже одного раза в неделю. Значение pH поддерживали в диапазоне 7,8–8,0. За 1 час до начала эксперимента животных отсаживали в ASW на пластиковые чашки без водорослей.

Подготовка амлодипина. Добавляли производное дигидропиридина амлодипин ($C_{20}H_{25}ClN_2O_5$, 2-[(2-аминоэтокси)метил]-4-(2-хлорфенил)-1,4-дигидро-6-метил-3,5-пиридин дикарбоновой кислоты 3-этил 5-метиловый эфир в виде безилата, Тева) в 96%-ный этиловый спирт или в воду (ASW) и пересчитывали концентрацию согласно растворимости этого соединения в указанных растворителях.

Электростимуляция. Для генерации последовательности прямоугольных импульсов заданной длительности и скважности применяли стандартную платформу Arduino Uno R3 на базе 8-битного микроконтроллера AVR ATmega328P. Для визуального контроля использовали светодиод LED1, для предотвращения случайного короткого замыкания встроили последовательно диод (D1, 1N4001). Среднее значение напряжения регулировали с помощью потенциометра R2 (10 кОм) от +10 мВ до +1,5 В на делителе напряжения, как показано на рис. 1. Электроды помещали в морскую воду в непосредственной близости от животного на расстоянии примерно 1 мм друг от друга. В качестве тест-контроля возможного влияния посторонних предметов на изменение поведения животного использовали пластиковые или деревянные палочки либо металлические электроды, отключённые от контроллера.

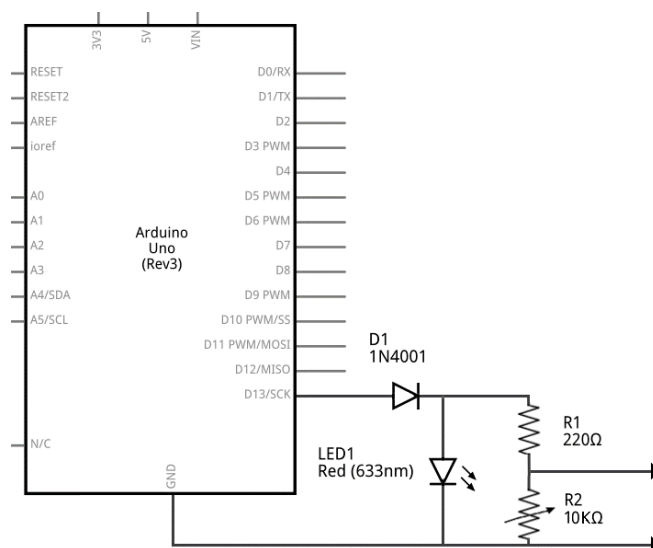


Рис. 1. Электронная схема для электростимуляции трихоплаксов

Fig. 1. Electronic circuit for *Trichoplax* electrical stimulation

Программный меандр. Продолжительность (длительность) импульсов и задержку (скважность) задавали программно в интервале от 0,5 мс до 10 с; программа выполнялась на контроллере в бесконечном цикле (см. Приложение 1: <https://doi.org/10.21072/mbj.2020.05.2.05>). Пересчёт временных интервалов (мс) в частоту (Гц) проводили с учётом того, что 1 Гц соответствует 1000 мс. Для создания пакетов п-образных импульсов с изменяющейся длительностью и задержкой внутри пакета использовали инкрементирующий и декрементирующий программные циклы с шагом 1 мс (см. Приложение 2: <https://doi.org/10.21072/mbj.2020.05.2.05>).

Микроскопия и обработка данных. Животных стимулировали электрическим током под стереомикроскопом ZEISS Stemi 305 при увеличении $\times 8$ и $\times 40$. Оценивали изменение поведения (двигательная активность, направление и траектория движения) и морфологических характеристик тела (опалесценция, форма). Выделяли стимулирующие и подавляющие воздействия, т. е. ведущие к повышению двигательной активности животного или к его обездвиживанию, шоку и параличу. Строение трихоплаксов изучали под инвертированным микроскопом Nikon Eclipse Ts2R с ДИК-оптикой при максимальном увеличении $\times 600$. Общий вид и поведенческую активность животных документировали с помощью фото- и видеосъёмки. Обработку видеоматериала провели с помощью утилиты FFmpeg на сервере Huawei Fusion Server RH2288 V3. Траектории движения трихоплаксов отслеживали с помощью плагина wrMTrack программы ImageJ (National Institutes of Health, USA) на графической станции Dell Precision T5810.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамика роста культуры. После посева животных на свежие маты из водорослей культура трихоплаксов в течение нескольких дней находилась в состоянии адаптации к новым условиям, что выражалось в отсутствии прироста численности и размеров особей. По прошествии такой лаг-фазы трихоплаксы начинали расти с последующим делением. На следующем этапе, который можно соотнести с экспоненциальной фазой роста культуры, трихоплаксы активно росли и делились пополам один раз в три-четыре дня путём образования перетяжки с уменьшением размеров дочерних особей. Переход в стационарную фазу роста культуры отмечали через две-три недели, что сопровождалось двукратным уменьшением средних размеров животных и резким замедлением темпов прироста их численности. В стареющих культурах наблюдали измельчание особей, изменение их формы (вытягивание либо, наоборот, образование мелких сфер, которые открепляются от субстрата

и всплывают), а также отмирание животных. Именно поэтому через пять-шесть недель культивирования трихоплаксов пересаживали на свежие маты из водорослей в количестве 10–20 особей на чашку, и процесс культивирования повторялся. Для экспериментов использовали преимущественно животных, отобранных на стационарной стадии роста культуры.

Эксперименты с одним электродом. В тестах с применением маленьких стержней из пластика, древесины или металла не было замечено ярко выраженной реакции животных на посторонние предметы. В случае использования электродов, подключённых к контроллеру Arduino Uno, из которых один (анод или катод) располагался вблизи трихоплакса (штамм Н2), а другой — на значительном расстоянии (более 1 см), животное обычно удалялось от электрического раздражителя на дистанцию длиной от одного до трёх размеров своего тела (1–3 мм) и продолжало медленно перемещаться в случайном направлении. При продолжительности импульсов 100 мс и задержке 1 мс трихоплаксы убегали сразу, а в случае задержки 1 с — отползали от электродов с запаздыванием в несколько десятков секунд. Отмечено, что животные, взятые в эксперимент из старой культуры, отличались меньшей чувствительностью к электрическому раздражителю, что выражалось в увеличении времени задержки реакции и в уменьшении расстояния, на которое они передвигались.

Эксперименты с двумя электродами. В случае размещения двух стержней из металлов с разным электрохимическим потенциалом, образующих гальваническую пару возле трихоплакса, животное проявляло двигательную активность — начинало «исследовать» пространство, приближаясь и удаляясь от электродов, пока не находило «комфортное» положение в образовавшемся слабом электрическом поле (рис. 2).

При использовании источника постоянного тока (200 мВ) трихоплаксы избегали катод, но не приближались к аноду, а отползали в сторону, иногда бродили между электродами. Если животные подползали слишком близко к аноду, они оставались возле него и через некоторое время сморщивались. Во многом скорость реакции и направление движения зависели от начального положения животного и от расстояния между электродами. Напряжение 1,2 В было летальным для животных, т. е. они обездвиживались, кардинально меняли морфологию, откреплялись от субстрата и в дальнейшем разрушались.

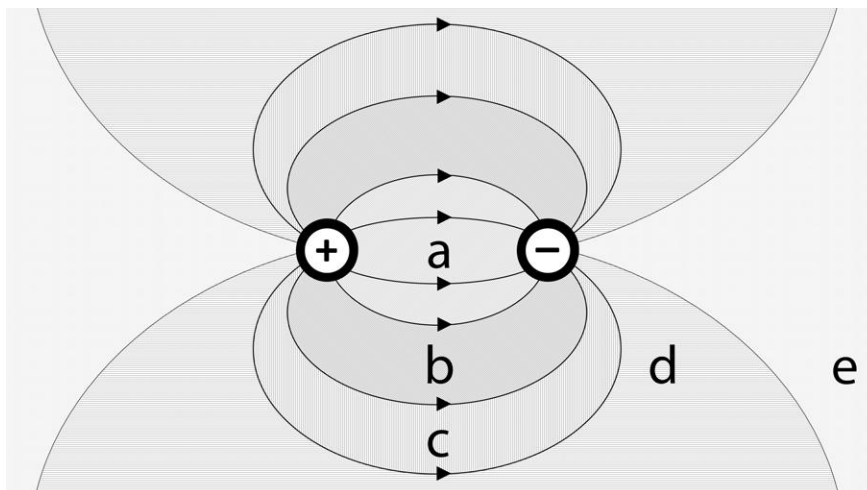


Рис. 2. Линии электрического поля в «электродной ловушке» для трихоплаксов: (а) «зона электродов» с расстоянием между электродами не более 1 мм; (б) зона обездвиживания соответствует расстоянию в один корпус трихоплакса (1 мм) от центра ловушки; (с) промежуточная зона; (д) зона вдали от электродов; (е) «зона комфорта» непосредственно за электродами (см. текст)

Fig. 2. Electric field lines in “electrode trap” for *Trichoplax*: (a) “electrode zone” with electrode gap no more than 1 mm; (b) immobilization zone corresponds to one *Trichoplax* body size (1 mm) from the center of the trap; (c) intermediate zone; (d) zone away from electrodes; (e) “comfort zone” just behind the electrodes (see the text for details)

Тестовые исследования проводили в морской воде с солёностью 35 ‰; применяли длительность и задержку импульсов по 35 мс (~ 30 Гц) со средним значением напряжения 50 мВ. Интересно, что в случае промышленной частоты (50 Гц) трихоплаксы не меняли существенно свою морфологию, начинали двигаться, предпочитали анод, отползали в сторону от электродов, иногда возвращались и снова удалялись от электродов.

Действие напряжения на трихоплаксов оценивали, варьируя амплитуду импульсов с помощью делителя напряжения при фиксированной частоте 20 Гц (см. Приложение 1: <https://doi.org/10.21072/mbj.2020.05.2.05>). Основным критерием оценки служила доля обездвиженных животных, которые не покинули «зону электродов» в течение нескольких минут. Дополнительным критерием были патологические изменения морфологии животных — утолщение ободка пластинки, округление формы и уменьшение опалесценции. Доля таких животных увеличивалась пропорционально росту напряжения (рис. 3). При напряжении 25 мВ практически все животные в конечном итоге покидали «зону электродов», а при напряжении 500 мВ они, напротив, оставались в её границах, приобретая патологические признаки, хотя на следующий день после снятия воздействия восстанавливали интактный вид. На основании полученных результатов в дальнейших опытах применяли напряжение 50 мВ.

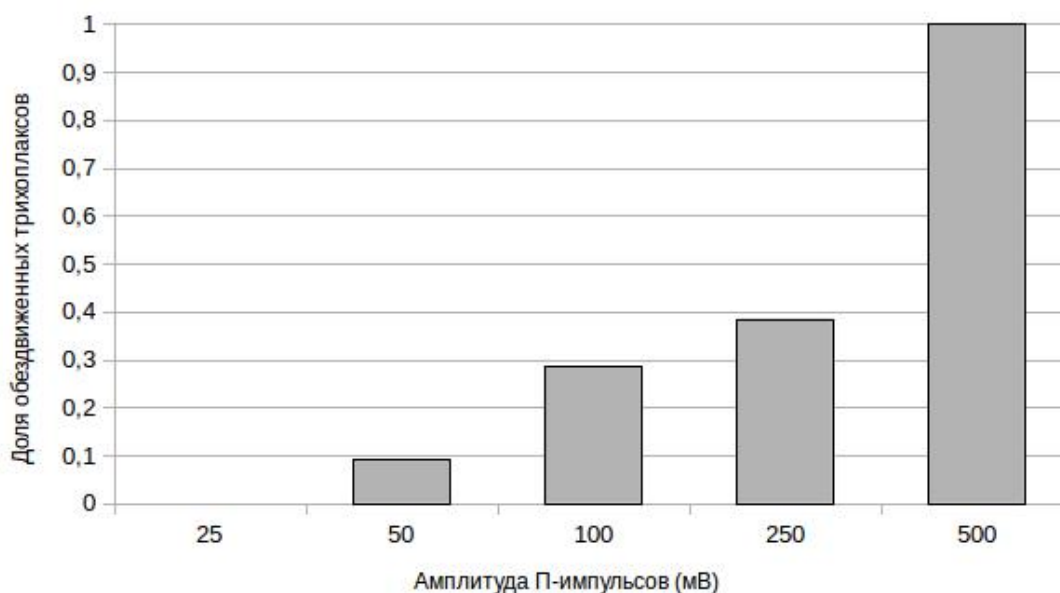


Рис. 3. Доля обездвиженных трихоплаксов *Trichoplax* sp. H2 по отношению к подвижным животным при различных значениях напряжения прямоугольных импульсов на частоте 20 Гц. В эксперименте использовано 59 животных

Fig. 3. Fraction of immobilized *Trichoplax* sp. H2 versus active animals at various voltage values of rectangular pulses at a frequency of 20 Hz. Totally 59 animals were used in the experiment

В основном мы использовали два активных электрода, расположенных в непосредственной близости по обе стороны пластинки трихоплакса. В качестве одного из действенных вариантов применяли импульсы с продолжительностью 100 мс и задержкой от 1 мс до 10 с. Для экспериментов использовали 139 животных штамма H2. В среднем для разных значений скважности в 67 % случаев наблюдали обездвиживание животных, помутнение по периферии и в центре пластинки с последующим уменьшением размеров и сморщиванием или сворачиванием трихоплакса. Данные изменения физиологического состояния и морфологи животного не были летальными. Трихоплаксы восстанавливались через несколько десятков минут после снятия воздействия раздражителя, что проявлялось в их распластывании на субстрате и в приобретении двигательной активности.

В опытах с двумя электродами, находящимися с одной стороны пластинки, вероятность покинуть зону стимулирующих электродов увеличивалась, причём у животного появлялась возможность движения в разных направлениях. Этот факт позднее использовали как характеристический признак для разных штаммов. В зоне обездвиживания возле электродов оставалось в среднем 56 % трихоплаксов.

Для уточнения полученных данных была проведена дополнительная серия опытов на 121 животном с использованием двух значительно отличающихся значений скважности, а именно задержки в 1 мс и 1 с, при длительности импульсов 100 мс. В случае размещения электродов на обеих сторонах пластинки трихоплакса доля уползших из зоны воздействия животных была незначительной и составляла 30 % при задержке 1 мс и 52 % — при задержке 1 с. В случае расположения электродов с одной стороны пластинки трихоплакса доля убежавших животных была больше и составляла 47 % для задержки каждого импульса в 1 мс и 76 % — для 1 с (рис. 4). Стоит отметить, что в опытах с двумя электродами по обе стороны животного трихоплаксу требовалось время для «принятия решения» о том, в каком направлении уползти из «электродной ловушки». Чаше трихоплакс двигался в сторону большей части своего тела, расположенной за пределами электродов.

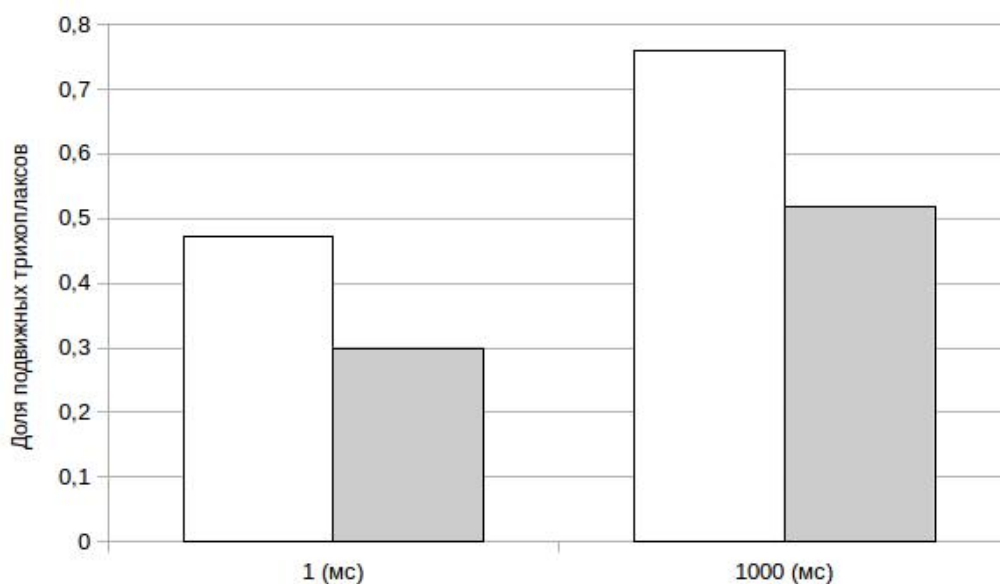


Рис. 4. Доля подвижных трихоплаксов *Trichoplax* sp. H2 по отношению к обездвиженным животным при длительности импульсов 100 мс и задержке 1 мс или 1 с; белый цвет — электроды на одном краю пластинки трихоплакса; серый цвет — электроды на противоположных краях пластинки трихоплакса. В эксперименте использовано 121 животное

Fig. 4. Fraction of active *Trichoplax* sp. H2 versus immobilized animals at pulse duration of 100 ms and delay of 1 ms or 1 s; white color indicates the electrodes on one side of *Trichoplax* plate; gray color indicates the electrodes on opposite sides of *Trichoplax* plate. Totally 121 animals were used in the experiment

Тестирование разных штаммов трихоплакса. В сравнительных опытах по воздействию прямоугольными импульсами со средним значением напряжения 50 мВ, коэффициентом заполнения 0,5 и частотой 2 Гц и 2 кГц на разные штаммы трихоплакса выявлено разнообразие паттернов поведения животных. Подсчитывали количество особей, передвигающихся от анода к катоду или наоборот — от катода к аноду. В экспериментах использовали 143 особи трихоплаксов; из них: штамм Н1 — 51 особь, штамм Н2 — 47, штамм Н13 — 45. В каждом опыте животному предстояло выбраться из «электродной ловушки», представляющей собой два электрода на противоположных краях тела (рис. 2). Проводили длительное наблюдение за изменением формы и за траекторией движения трихоплаксов (см. Приложение 3: <https://doi.org/10.21072/mbj.2020.05.2.05>). Представители штаммов Н1 и Н13 перемещались в сторону уменьшения плотности силовых линий напряжённости

электрического поля и иногда вытягивались вдоль этих воображаемых линий (рис. 5). Животные штамма Н2, не удаляясь значительно от электродов, переползали на их обратную сторону — в «зону комфорта» с малой плотностью силовых линий электрического поля (табл. 1). Так, при низкой частоте (2 Гц) особи штамма Н1 в большинстве случаев удалялись от электродов по вытянутой траектории и часто заползали за один из электродов в «зону комфорта». Животные штамма Н2 предпочитали перемещаться за катод, хотя иногда блуждали между электродами и отползали в итоге на небольшое расстояние или уходили за анод. Представители штамма Н13 чаще удалялись от анода в сторону катода и перемещались за него. При использовании высокой частоты (2 кГц) особи штамма Н1 предпочитали анод, часто оставались в «зоне электродов», теряли двигательную активность и сморщивались. Особи штамма Н2 быстро подползали к аноду или оставались недалеко от электродов, что нередко приводило к их обездвиживанию. Особи штамма Н13 обычно удалялись от анода к катоду и заползали за катод. Для них также отмечены замедление реакции, обездвиживание и сморщивание при частоте 2 кГц.

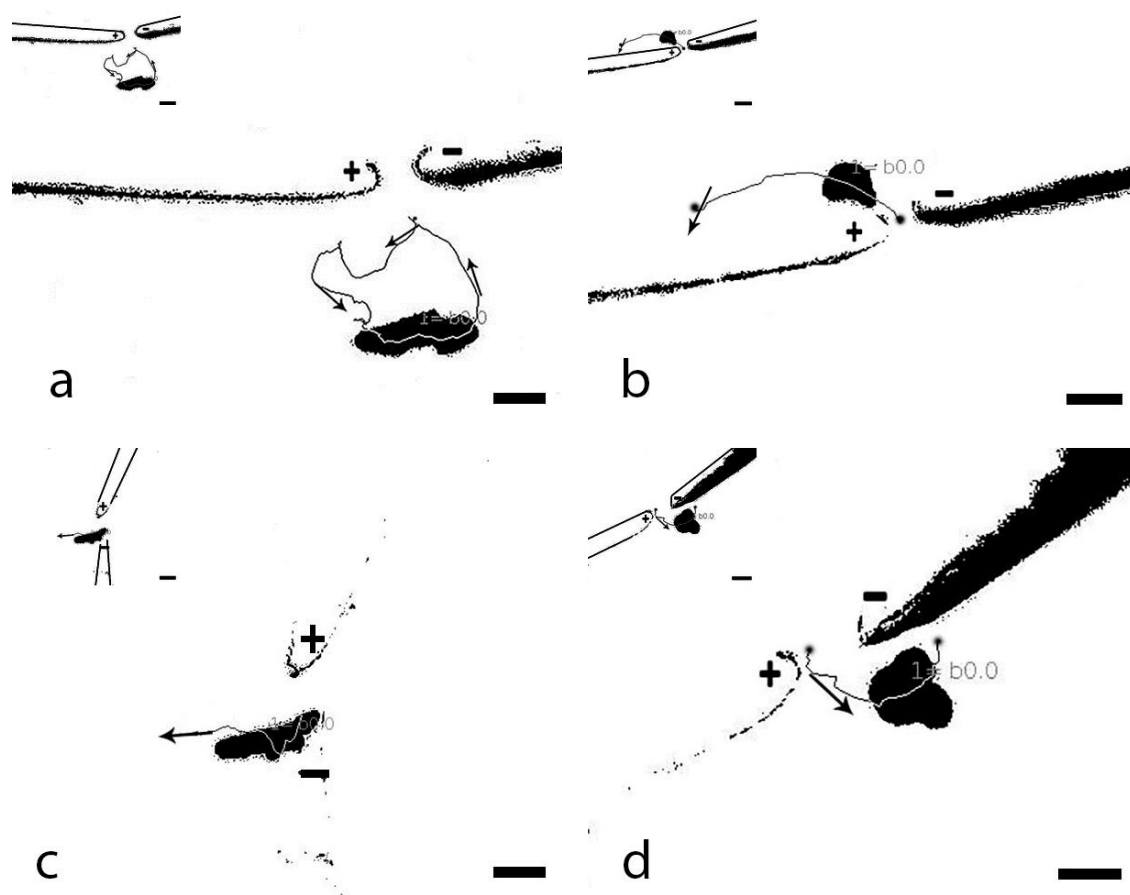


Рис. 5. Изменение формы *Trichoplax adhaerens* Н1 и траектории движения из «электродной ловушки»: (а) поисковое движение и вытягивание трихоплакса вдоль линии напряжённости электрического поля; направленное движение трихоплаксов в «зону комфорта», расположенную: (b) за анодом, (c) в отдалении от электродов, (d) за катодом. Стрелки указывают направление движения трихоплакса; цифры на рисунке обозначают присвоенную животному метку; «+» — анод; «-» — катод; длина отрезка — 1 мм; графическая вставка в левом верхнем углу объясняет изображение

Fig. 5. Change of *Trichoplax adhaerens* H1 shape and motion trajectory from the “electrode trap”: (a) seeking activity and elongation of *Trichoplax* along the line of electric field intensity; the directed motion of *Trichoplax* into the “comfort zone” located: (b) behind the anode, (c) far from the electrodes, and (d) behind the cathode. Arrows demonstrate *Trichoplax* motion direction; numbers in the figure indicate identification code assigned to the animal; “+” is the anode; “-” is the cathode; every bar length = 1 mm; graphic insert in the upper left corner explains the image

Таблица 1. Паттерны поведения трихоплаксов между электродами при воздействии прямоугольными импульсами разной частоты

Table 1. Behavioral patterns of *Trichoplax* between electrodes when exposed to rectangular pulses of various frequencies

Гаплотип	Частота прямоугольных импульсов	
	2 Гц	2 кГц
H1	движется по удалённой траектории за один из электродов	удаляется от катода в направлении анода либо остаётся в «зоне электродов»
H2	блуждает между электродами, перемещается за катод или анод, отползает	быстро приближается к аноду, блуждает, располагается близко к электродам
H13	отползает от анода и иногда переползает за катод	отчётливо удаляется от анода, заползает за катод

Эксперименты в режимах функционирования кальциевых каналов. Чтобы предположительно открыть кальциевые каналы трихоплакса TCa_v3 *in vivo*, мы применяли прямоугольные импульсы со средним напряжением 50 мВ, с коэффициентом заполнения 0,5 и частотами 2,5 Гц, 5 Гц и 2 кГц. Частоты заимствованы из работ [3 ; 20 ; 33]. Выраженные различия в эффектах обнаружены на частотах 2,5 Гц и 2 кГц. При частоте 2,5 Гц трихоплаксы не меняли морфологию, медленно отползали от анода в сторону катода и перемещались за катод. При частоте 2 кГц, напротив, трихоплаксы, преимущественно двигались к аноду, однако не удалялись далеко от электродов, меняли общий вид клеточной массы с прозрачного и блестящего на непрозрачный и тусклый, в конечном итоге уменьшались в размере, сворачивались и отделялись от субстрата.

При применении частот, использованных в методике patch-clamp [33], а именно при длительности и задержке импульсов по 2 мс (500 Гц) или 500 мс (2 Гц), трихоплаксы в случае частоты 2 Гц не меняли видимой морфологии и ползли от анода к катоду, а в случае частоты 500 Гц они преимущественно двигались от катода за анод либо оставались неподвижными и скручивались.

Для того чтобы предположительно открыть кальциевые каналы трихоплакса TCa_v3 *in vivo*, мы применяли прямоугольные импульсы со средним напряжением от 10 до 120 мВ, соответствующие задержкам от 10 с до 1 мс. Длительность импульсов составляла 35 мс, как в работе [36]. Для оценки кумулятивного действия п-образных импульсов на трихоплакса *Trichoplax* sp. H2, опосредованного каналом TCa_v3 , использованы задержки от 1 мс до 10 с. Физиологический эффект от суммарного действия импульсов проявлялся через несколько десятков секунд и выглядел как зависимость подвижности животных от скважности в последовательности импульсов. При низкой скважности, т. е. при высокой частоте и большом количестве поступающих сигналов, доля обездвиженных животных была велика — 78 и 80 % для задержек 1 и 10 мс соответственно (рис. 6). По мере роста скважности доля парализованных трихоплаксов понижалась до 44 % и 17 % в случае одного импульса в 1 с и одного импульса в 10 с соответственно. В контрольных экспериментах без электрического воздействия обездвиженные трихоплаксы отсутствовали.

Блокировка кальциевых каналов. Для доказательства специфичности действия импульсных токов на потенциалзависимые кальциевые каналы трихоплакса TCa_v3 использован ингибитор активности этих каналов амлодипин.

При наличии малого количества амлодипина (25 нМ), несмотря на обработку электрическими импульсами длительностью 35 мс с задержкой 10 мс, практически все трихоплаксы (штамм H2) в течение нескольких минут сохраняли нативную морфологию и подвижность, предпочитая двигаться к аноду, а потом удаляться от него, что свидетельствовало о предотвращении электрошока, наблюдаемого при низкой скважности (рис. 6). Для выявления возможных мишеней мы воздействовали на трихоплаксов пакетами прямоугольных импульсов переменной ширины и скважности с шагом 1 мс, охватывающими диапазон частот от 1 Гц до 1 кГц (см. Приложение 2:

<https://doi.org/10.21072/mbj.2020.05.2.05>). Отмечены обездвиживание животных и образование розеток, доля которых уменьшалась при наличии 25 нМ амлодипина. Между тем через несколько часов все трихоплаксы диссоциировали под действием амлодипина на отдельные клетки.

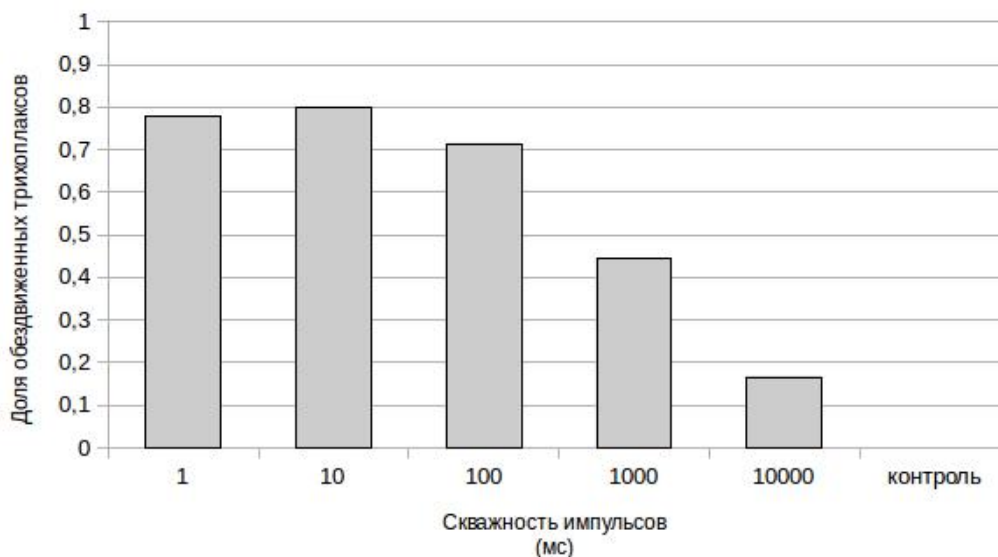


Рис. 6. Доля обездвиженных трихоплаксов *Trichoplax* sp. H2 по отношению к подвижным животным при длительности импульсов 35 мс и задержке от 1 мс до 10 с. В эксперименте использовано 65 животных

Fig. 6. Fraction of immobilized *Trichoplax* sp. H2 versus active animals at pulse duration of 35 ms and delay of 1 ms to 10 s. Totally 65 animals were used in the experiment

В заключительной серии опытов изучали влияние на трихоплаксов амлодипина в больших дозах. Амлодипин в концентрации 50 мкМ вызывал быстрое сворачивание краёв трихоплаксов в розетку в вентрально-дорсальном направлении и последующую диссоциацию пластинки на отдельные клетки (рис. 7). При понижении концентрации амлодипина до 2,5 мкМ формирование розеток продолжалось в течение нескольких минут; это позволило зарегистрировать движение животных к аноду при длительности и задержке импульсов по 35 мс [36], что соответствует частоте 28,57 Гц. При использовании концентрации амлодипина 250 нМ наблюдали постепенное потемнение трихоплаксов — сначала по периферии, а потом и в центре пластинки. Наружный ободок утолщался, трихоплаксы округлялись, образуя изрезанный фестончатый край, лопасти которого отрывались от субстрата, загибались вверх и формировали розетку. Находясь в «электродной ловушке», животные двигались дискоординированно и не могли покинуть электронную западню. Далее наступала ригидность пластинки трихоплаксов, что выражалось в постоянстве формы животных при движении. Паттерны перемещения отдельных особей в электрическом поле тем не менее сохранялись: трихоплаксы двигались преимущественно к аноду. Позднее края пластинки, напоминавшие лопасти, загибались вверх и внутрь. Примерно через 1 ч после добавления амлодипина происходила диссоциация животных на отдельные клетки, сначала по периферии, а потом — и всего организма.

Штаммы трихоплакса H1 и H13 показывали, подобно штамму H2, изменение морфологии под действием 25 нМ амлодипина и нарушение амёбоидного движения с течением времени. В экспериментах без амлодипина аналогичных явлений не наблюдали. В отсутствие химических воздействий животные блуждали между электродами, размещались в «зоне комфорта» или удалялись на безопасное расстояние от электродов. Следует отметить, что недигидропиридиновые блокаторы Са-каналов, такие как верапамил и дилтиазем в концентрации 100 мкМ, не оказывали заметного воздействия на трихоплаксов штамма H2, которые сохраняли жизнеспособность при наличии этих веществ в течение суток [данные не представлены].

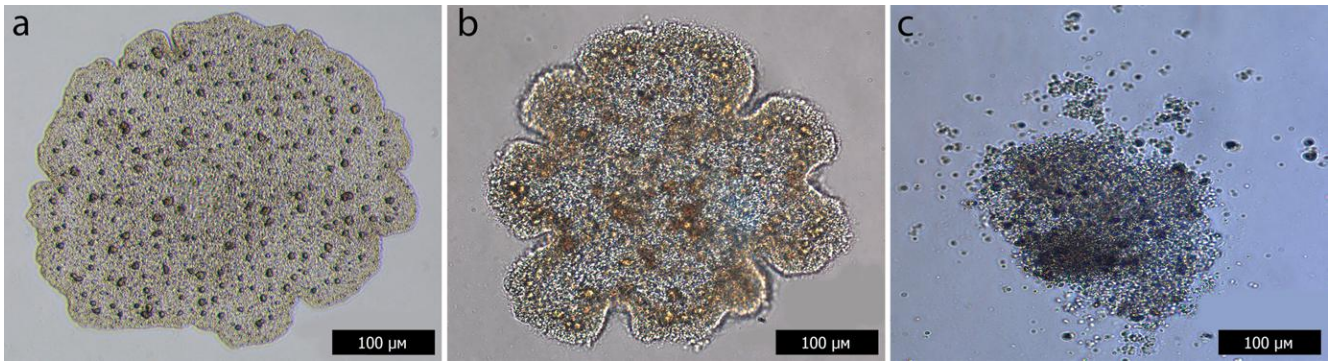


Рис. 7. Последовательное действие амлодипина (50 мкМ) на *Trichoplax* sp. H2: (а) интактное животное; (б) сворачивание трихоплакса в розетку через 30 мин.; (с) диссоциация трихоплакса на отдельные клетки через 60 мин.; длина отрезка — 100 мкм

Fig. 7. Time-dependent effect of amlodipine (of 50 μM) on *Trichoplax* sp. H2: (a) intact animal; (b) folding into a pan after 30 minutes; (c) dissociation into individual cells after 60 minutes; bar length = 100 μm

ОБСУЖДЕНИЕ

В связи с повсеместным распространением низкочастотных электромагнитных излучений, вызывающих множественные физиологические эффекты у человека [26 ; 44], актуален поиск тест-объектов для изучения механизмов действия НЭМИ. *Trichoplax adhaerens* был предложен в качестве тестовой лабораторной модели недавно [1]. Нами изучено действие прямоугольных электрических импульсов различной амплитуды, длительности и скважности на три лабораторных штамма трихоплакса (Н1, Н2, Н13).

В контрольных тестах с использованием стержней из дерева, пластика или металла не было замечено реакции животного на посторонние предметы, размещённые возле него, за исключением случаев образования гальванической пары. Под воздействием слабого постоянного тока с напряжением 200 мВ трихоплаксы штамма Н2 отползали от электродов, однако быстрота реакции и траектория движения во многом зависели от первоначального положения животного по отношению к электродам. Когда применяли активные электроды, один из которых (анод или катод) располагали вблизи трихоплакса, животное обычно удалялось от раздражителя. При позиционировании обоих электродов возле пластинки трихоплакса зарегистрированы различные паттерны движения к аноду или катоду в зависимости от режима стимуляции и штамма животного — «положительная» миграция к аноду, «отрицательная» миграция к катоду и «переменная» миграция, когда животное несколько раз меняло предпочтение анод — катод. В случае попадания трихоплакса в зону непосредственной близости к электродам животному не всегда удавалось выбраться из «электродной ловушки», что напрямую зависело от увеличения амплитуды и числа импульсов. Вдали от электродов трихоплаксы иногда вытягивались вдоль линий напряжённости электрического поля и направлялись в предполагаемую «зону комфорта» с наименьшей напряжённостью электрического поля на обратной стороне электродов.

В сравнительных экспериментах по воздействию прямоугольными импульсами частотой 2 Гц и 2 кГц на разные штаммы трихоплакса выявлено, что *Trichoplax* sp. H2 является более реактивным и демонстрирует более выраженные физиологические ответы на частотах 2 Гц и 2 кГц, чем штамм Н1 и особенно штамм Н13, в основном мигрирующий от анода к катоду. Именно поэтому большинство экспериментов проведено на штамме Н2. Несмотря на предпочтительное движение трихоплаксов штамма Н2 в сторону катода при низких частотах импульсного тока (около 2 Гц), отмечена тенденция постепенного изменения направления миграции в сторону анода при повышении частоты импульсов (до 2 кГц). Тем не менее следует обратить внимание на неожиданно широкую индивидуальную изменчивость в поведении трихоплаксов, что затрудняет подобные интерпретации и требует дальнейших исследований.

Достаточное внимание уделено временным режимам, ранее использованным другими авторами при детальном изучении кальциевых каналов L- и T-типов [3 ; 20 ; 33 ; 34 ; 36]. Мы исследовали воздействия в диапазоне частот от 2 Гц до 2 кГц. Поведенческие реакции трихоплакса не были однозначными: экстремальные частоты порой не оказывали ожидаемого воздействия либо приводили к электрошоку трихоплакса, выражающемуся в отсутствии движения, помутнении пластинки, уменьшении размера и сморщивании животного, что связано, возможно, с физиологическим состоянием трихоплакса и/или с начальным положением животного в «электродной ловушке». Эти воздействия были обратимы; по прошествии времени или после возвращения животного на мат из водорослей трихоплаксы восстанавливали свою двигательную активность.

В зависимости от длительности стимулирующих импульсов и их числа менялись двигательные реакции и морфология животных: от стохастической или направленной миграции к аноду/катоде или от него до обездвиживания животных, увеличения оптической плотности, сначала по периферии, а потом и в центре пластинки, до сморщивания трихоплакса и даже до отделения его от субстрата. Применяемое воздействие имело кумулятивный характер, который связан, вероятно, с работой кальциевых каналов и активностью нисходящих регуляторных каскадов [10]. Известно, что железистые клетки, расположенные на периферии трихоплакса, экспрессируют потенциалзависимые кальциевые каналы [32 ; 39]. Наблюдаемые морфологические изменения в краевой ободке пластинки трихоплакса могут быть связаны с опосредованными кальциевыми каналами ответами секреторных клеток, содержащих регуляторные нейропептиды [42]. С другой стороны, показано, что патофизиологические эффекты НЭМИ сопряжены на молекулярном уровне с путём регуляции Ca^{2+} /оксид азота/пероксинитрит, а положительное физиологическое действие НЭМИ объясняется альтернативным путём Ca^{2+} /оксид азота/cGMP/протеинкиназа G [19]. Взаимоисключающие поведенческие реакции трихоплаксов, как, например, положительная и отрицательная электромиграция, на варьирующие режимы электрического воздействия (табл. 1) могут быть обусловлены вовлечением в поведенческие реакции различных сигнальных путей с участием ионов кальция.

Считается, что амлодипин, связываясь с дигидропиридиновыми рецепторами, блокирует кальциевые каналы L- и T-типов, что приводит к уменьшению переноса Ca^{2+} в клетку. Амлодипин, благодаря регуляции концентрации ионов Ca^{2+} в клетке, также обладает антиоксидантными свойствами и способствует выработке нейромедиатора оксида азота [4 ; 11 ; 14 ; 16 ; 25]. Дополнительные эксперименты с амлодипином показали, что этот блокатор кальциевых каналов способен в низких концентрациях (25 нМ) кратковременно нивелировать шоковый эффект электрических импульсов прямоугольной формы в режиме длительности 35 мс и задержки 10 мс, приводящий обычно к обездвиживанию *Trichoplax* sp. H2 без применения амлодипина. Используя программный меандр с шагом 1 мс и изучая ответы трихоплаксов на пакеты прямоугольных импульсов, мы просканировали потенциальные клеточные мишени в интервале частот от 1 Гц до 1 кГц. Снижение негативного эффекта НЭМИ в этом диапазоне с помощью амлодипина в концентрации 25 нМ может свидетельствовать о том, что НЭМИ действует на кальциевые каналы L- и/или T-типа трихоплакса.

Кроме снятия воздействия электрического раздражителя на животных с помощью амлодипина, мы наблюдали и другие эффекты. Так, применение данного антагониста кальция в высокой концентрации (> 2,5 мкМ) приводило к диссоциации трихоплаксов на отдельные клетки, что непосредственно вызывается разрушением кальциевых мостиков [28]. При использовании этого кальциевого блокатора в умеренной концентрации (< 250 нМ) отмечено нарушение амёбoidalного движения трихоплаксов, что может быть продиктовано падением функциональной активности клеток, иницирующих движения, нарушением распространения волн активации или нарушением синтеза оксида азота, играющего, возможно, определённую роль в быстрых сокращениях дорсального эпителия [2 ; 11 ; 16 ; 25]. Следует заметить, что при этом сохранялась остаточная подвижность ригидных животных, обеспечиваемая ресничками, что указывает на независимость упомянутого процесса от регуляции ионами кальция.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что амлодипин тормозит работу кальциевых каналов у трихоплакса, что проявляется как в снижении реактивности животных при низкой концентрации блокатора Ca^{2+} -каналов, так и в диссоциации клеток, составляющих животное, при высокой концентрации антагониста кальция. Следует отметить, что действие амлодипина сходно с таковым компаунда ML218 — специфического блокатора кальциевых каналов Т-типа у человека. Так, электрофизиологические исследования нейронов субталамического ядра при наличии ML218 выявили ингибирующее действие ML218 на кальциевые каналы Т-типа, подавление низкопорогового ответа и торможение всплеска активности нейронов [47].

Предположение в пользу Ca^{2+} -каналов Т-типа было подтверждено в дополнительных экспериментах на трихоплаксах штамма Н2, где, помимо амлодипина, который является одним из дигидропиридиновых блокаторов кальциевых каналов, испытывали недигидропиридиновые блокаторы кальциевых каналов, такие как верапамил и дилтиазем. Амлодипин приводил к диссоциации трихоплаксов на отдельные клетки, в то время как верапамил и дилтиазем не оказывали такого воздействия на животных. Данный факт служит подтверждением того, что амлодипин блокирует низкопороговый Ca^{2+} -канал TCa_v3 трихоплакса: амлодипин является блокатором кальциевых каналов L- и Т-типов, а верапамил и дилтиазем — блокаторами высокопороговых кальциевых каналов L-типа.

Следует отметить, что движение трихоплаксов не было строго целенаправленным, а напоминало «стохастический» таксис [38], кинезис или движение к цели методом проб и ошибок. Это говорит об отсутствии у трихоплакса некоего центрального регулятора и указывает, возможно, на распределённое управление и коллективное принятие решений между клетками, что в некоторых случаях приводит к затягиванию ответа системы на стимулы [6].

Заключение. Изучение электрофизиологии трихоплакса является важным в связи с широким распространением низкочастотного электромагнитного излучения и вызывает интерес из-за простейшего строения животного и лёгкости его культивирования, что в перспективе даёт возможность понимания механизмов его поведения и движения. Обнаруженные в наших экспериментах разнообразные ответы трихоплакса на электрические раздражители свидетельствуют о скрытых возможностях этого организма, основанных на коллективном действии составляющих его клеток.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Закономерности формирования и антропогенная трансформация биоразнообразия и биоресурсов Азово-Черноморского бассейна и других районов Мирового океана» (№ гос. регистрации АААА-А18-118020890074-2) и при поддержке гранта Правительства Российской Федерации по Постановлению № 220 (договор № 14. W03.31.0015 от 28.02.2017).

Благодарность. К. А. В. выражает признательность Горбунову Р. В. и Морозу Л. Л. за возможность работать в лаборатории биоразнообразия и функциональной геномики Мирового океана ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»; хранителям коллекций — за штаммы трихоплакса; сотрудникам лаборатории Баяндиной Ю. С., Водясовой Е. А. и Кирину М. П. — за помощь и поддержку; Романовой Д. Ю., Челебиевой Э. С., Пономарёвой А. А., Колесниковой Е. Э. и Карташову Л. Е. — за консультацию. Авторы благодарны анонимным рецензентам за полезные замечания, позволившие улучшить рукопись.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Albertini M. C., Fraternali D., Semprucci F., Cecchini S., Colomba M., Rocchi M. B. L., Sisti D., Di Giacomo B., Mari M., Sabatini L., Cesaroni L., Balsamo M., Guidi L. Bioeffects of *Prunus spinosa* L. fruit ethanol extract on reproduction and phenotypic plasticity of *Trichoplax adhaerens* Schulze, 1883 (Placozoa). *PeerJ*, 2019, vol. 7, article e6789 (22 p.). <https://doi.org/10.7717/peerj.6789>
2. Armon S., Bull M. S., Aranda-Diaz A., Prakash M. Ultrafast epithelial contractions provide insights into contraction speed limits and tissue integrity. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 2018, vol. 115, no. 44, pp. E10333–E10341. <https://doi.org/10.1073/pnas.1802934115>
3. Bers D. M., Perez-Reyes E. Ca channels in cardiac myocytes: Structure and function in Ca

- influx and intracellular Ca release. *Cardiovascular Research*, 1999, vol. 42, iss. 2, pp. 339–360. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00038-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00038-3)
4. Catterall W. A. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2011, vol. 3, iss. 8, article 003947 (23 p.). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003947>
 5. Chandler N. J., Greener I. D., Tellez J. O., Inada S., Musa H., Molenaar P., Difrancesco D., Baruscotti M., Longhi R., Anderson R. H., Biller R., Sharma V., Sigg D. C., Boyett M. R., Dobrzynski H. Molecular architecture of the human sinus node: Insights into the function of the cardiac pacemaker. *Circulation*, 2009, vol. 119, no. 12, pp. 1562–1575. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.804369>
 6. d'Alessandro J., Mas L., Aubry L., Rieu J. P., Rivière C., Anjard C. Collective regulation of cell motility using an accurate density-sensing system. *Journal of the Royal Society Interface*, 2018, vol. 15, iss. 140, article 20180006 (11 p.). <https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0006>
 7. DuBuc T. Q., Ryan J. F., Martindale M. Q. “Dorsal-Ventral” genes are part of an ancient axial patterning system: Evidence from *Trichoplax adhaerens* (Placozoa). *Molecular Biology and Evolution*, 2019, vol. 36, iss. 5, pp. 966–973. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz025>
 8. Eitel M., Francis W. R., Varoqueaux F., Daraspe J., Osigus H. J., Krebs S., Vargas S., Blum H., Williams G. A., Schierwater B., Wörheide G. Correction: Comparative genomics and the nature of placozoan species. *PLoS Biology*, 2018, vol. 16, no. 9, article e3000032 (1 p.). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005359>
 9. Eitel M., Francis W. R., Varoqueaux F., Daraspe J., Osigus H. J., Krebs S., Vargas S., Blum H., Williams G. A., Schierwater B., Wörheide G. Comparative genomics and the nature of placozoan species. *PLoS Biology*, 2018, vol. 16, no. 7, article E2005359 (36 p.). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005359>
 10. Gao R., Zhao S., Jiang X., Sun Y., Zhao S., Gao J., Borleis J., Willard S., Tang M., Cai H., Kamimura Y., Huang Y., Jiang J., Huang Z., Mogilner A., Pan T., Devreotes P. N., Zhao M. A large-scale screen reveals genes that mediate electrotaxis in *Dictyostelium discoideum*. *Science Signaling*, 2015, vol. 8, iss. 378, pp. ra50 (10 p.). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aab0562>
 11. Godfraind T. Discovery and development of calcium channel blockers. *Frontiers in Pharmacology*, 2017, vol. 8, article 286 (25 p.). <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00286>
 12. Grassi C., D'Ascenzo M., Torsello A., Martinotti G., Wolf F., Cittadini A., Azzena G. B. Effects of 50 Hz electromagnetic fields on voltage-gated Ca²⁺ channels and their role in modulation of neuroendocrine cell proliferation and death. *Cell Calcium*, 2004, vol. 35, iss. 4, pp. 307–315. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2003.09.001>
 13. Heyland A., Croll R., Goodall S., Kranyak J., Wyeth R. *Trichoplax adhaerens*, an enigmatic basal metazoan with potential. In: *Developmental Biology of the Sea Urchin and Other Marine Invertebrates: Methods and Protocols* / D. J. Carroll, S. A. Stricker (Eds). New York : Humana Press, 2014, chap. 4, pp. 45–61. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-974-1_4
 14. Iftinca M. C. Neuronal T-type calcium channels: What's new? *Journal of Medicine and Life*, 2011, vol. 4, iss. 2, pp. 126–138.
 15. Kamm K., Osigus H. J., Stadler P. F., DeSalle R., Schierwater B. *Trichoplax* genomes reveal profound admixture and suggest stable wild populations without bisexual reproduction. *Scientific Reports*, 2018, vol. 8, iss. 1, article 11168 (11 p.). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29400-y>
 16. Kopecky B. J., Liang R., Bao J. T-type calcium channel blockers as neuroprotective agents. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology*, 2014, vol. 466, iss. 4, pp. 757–765. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1454-x>
 17. Kuznetsov A. V., Halaimova A. V., Ufimtseva M. A., Chelebieva E. S. Blocking a chemical communication between *Trichoplax* organisms leads to their disorderly movement. *International Journal of Parallel, Emergent and Distributed Systems*, 2020, vol. 35, iss. 4, pp. 473–482. <https://doi.org/10.1080/17445760.2020.1753188>
 18. Lawrence A. F., Adey W. R. Nonlinear wave mechanisms in interactions between excitable tissue and electromagnetic fields. *Neurological Research*, 1982, vol. 4, iss. 1–2, pp. 115–153. <https://doi.org/10.1080/01616412.1982.11739619>
 19. Ledoigt G., Belpomme D. Cancer induction molecular pathways and HF-EMF irradiation. *Advances in Biological Chemistry*, 2013, vol. 3, pp. 177–186. <https://doi.org/10.4236/abc.2013.32023>
 20. Linz K. W., Meyer R. Control of L-type calcium current during the action potential of guinea-pig ventricular myocytes. *Journal of Physiology*, 1998, vol. 513,

- pt. 2, pp. 425–442. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.425bb.x>
21. Lipscombe D., Andrade A. Calcium channel $Ca_v\alpha_1$ splice isoforms – Tissue specificity and drug action. *Current Molecular Pharmacology*, 2015, vol. 8, iss. 1, pp. 22–31. <https://doi.org/10.2174/1874467208666150507103215>
 22. Marchionni I., Paffi A., Pellegrino M., Liberti M., Apollonio F., Abeti R., Fontana F., D’Inzeo G., Mazzanti M. Comparison between low-level 50 Hz and 900 MHz electromagnetic stimulation on single channel ionic currents and on firing frequency in dorsal root ganglion isolated neurons. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 2006, vol. 1758, iss. 5, pp. 597–605. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.03.014>
 23. Moran Y., Barzilai M. G., Liebeskind B. J., Zakon H. H. Evolution of voltage-gated ion channels at the emergence of Metazoa. *Journal of Experimental Biology*, 2015, vol. 218, pt. 4, pp. 515–525. <https://doi.org/10.1242/jeb.110270>
 24. Nanou E., Catterall W. A. Calcium channels, synaptic plasticity, and neuropsychiatric disease. *Neuron*, 2018, vol. 98, iss. 3, pp. 466–481. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.03.017>
 25. Pall M. L. Electromagnetic fields act *via* activation of voltage-gated calcium channels to produce beneficial or adverse effects. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2013, vol. 17, iss. 8, pp. 958–965. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12088>
 26. Pall M. L. Microwave frequency electromagnetic fields (EMFs) produce widespread neuropsychiatric effects including depression. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 2016, vol. 75, pt. B, pp. 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2015.08.001>
 27. Ritter J. M., Flower R. J., Henderson G., Loke Y. K., MacEwan D., Rang H. P. *Rang & Dale’s Pharmacology*. 9th edition. Elsevier, 2019, 808 p.
 28. Ruthmann A., Terwelp U. Disaggregation and reaggregation of cells of the primitive metazoan *Trichoplax adhaerens*. *Differentiation*, 1979, vol. 13, iss. 3, pp. 185–198. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1979.tb01581.x>
 29. Santini M. T., Rainaldi G., Indovina P. L. Cellular effects of extremely low frequency (ELF) electromagnetic fields. *International Journal of Radiation Biology*, 2009, vol. 85, iss. 4, pp. 294–313. <https://doi.org/10.1080/09553000902781097>
 30. Schierwater B. My favorite animal, *Trichoplax adhaerens*. *BioEssays*, 2005, vol. 27, iss. 12, pp. 1294–1302. <https://doi.org/10.1002/bies.20320>
 31. Schulze F. E. *Trichoplax adhaerens*, nov. gen., nov. spec. *Zoologischer Anzeiger*, 1883, vol. 6, pp. 92–97.
 32. Senatore A., Raiss H., Le P. Physiology and evolution of voltage-gated calcium channels in early diverging animal phyla: Cnidaria, Placozoa, Porifera, and Ctenophora. *Frontiers in Physiology*, 2016, vol. 7, article 481. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00481>
 33. Shiels H. A., Vornanen M., Farrell A. P. Temperature dependence of cardiac sarcoplasmic reticulum function in rainbow trout myocytes. *Journal of Experimental Biology*, 2002, pt. 23, pp. 3631–3639.
 34. Shiels H. A., Vornanen M., Farrell A. P. Temperature-dependence of L-type Ca^{2+} channel current in atrial myocytes from rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*, 2000, pt. 18, pp. 2771–2780.
 35. Simms B. A., Zamponi G. W. Neuronal voltage-gated calcium channels: Structure, function, and dysfunction. *Neuron*, 2014, vol. 82, iss. 1, pp. 24–45. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.016>
 36. Smith C. L., Abdallah S., Wong Y. Y., Le P., Har-racksingh A. N., Artinian L., Tamvacakis A. N., Rehder V., Reese T. S., Senatore A. Evolutionary insights into T-type Ca^{2+} channel structure, function, and ion selectivity from the *Trichoplax adhaerens* homologue. *Journal of General Physiology*, 2017, vol. 149, iss. 4, pp. 483–510. <https://doi.org/10.1085/jgp.201611683>
 37. Smith C. L., Pivovarova N., Reese T. S. Coordinated feeding behavior in *Trichoplax*, an animal without synapses. *PLoS One*, 2015, vol. 10, iss. 9, article e0136098 (15 p.). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136098>
 38. Smith C. L., Reese T. S., Govezensky T., Barrio R. A. Coherent directed movement toward food modeled in *Trichoplax*, a ciliated animal lacking a nervous system. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 2019, vol. 116, no. 18, pp. 8901–8908. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815655116>
 39. Smith C. L., Varoqueaux F., Kittelmann M., Az-zam R. N., Cooper B., Winters C. A., Eitel M., Fasshauer D., Reese T. S. Novel cell types, neurosecretory cells, and body plan of the early-diverging metazoan *Trichoplax adhaerens*. *Current Biology*, 2014, vol. 24, iss. 14, pp. 1565–1572. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.05.046>
 40. Srivastava M., Begovic E., Chapman J., Putnam N. H., Hellsten U., Kawashima T., Kuo A., Mitros T., Salamov A., Carpenter M. L.,

- Signorovitch A. Y., Moreno M. A., Kamm K., Greenwood J., Schmutz J., Shapiro H., Grigoriev I. V., Buss L. W., Schierwater B., Dellaporta S. L., Rokhsar D. S. The *Trichoplax* genome and the nature of placozoans. *Nature*, 2008, vol. 454, no. 7207, pp. 955–960. <https://doi.org/10.1038/nature07191>
41. Sun Z. C., Ge J. L., Guo B., Guo J., Hao M., Wu Y. C., Lin Y. A., La T., Yao P. T., Mei Y. A., Feng Y., Xue L. Extremely low frequency electromagnetic fields facilitate vesicle endocytosis by increasing presynaptic calcium channel expression at a central synapse. *Scientific Reports*, 2016, vol. 6, article 21774 (11 p.). <https://doi.org/10.1038/srep21774>
 42. Varoquaux F., Williams E. A., Grandemange S., Truscello L., Kamm K., Schierwater B., Jékely G., Fasshauer D. High cell diversity and complex peptidergic signaling underlie placozoan behavior. *Current Biology*, 2018, vol. 28, iss. 21, pp. 3495–3501 (10 p.). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.08.067>
 43. Vianale G., Reale M., Amerio P., Stefanachi M., Di Luzio S., Muraro R. Extremely low frequency electromagnetic field enhances human keratinocyte cell growth and decreases proinflammatory chemokine production. *British Journal of Dermatology*, 2008, vol. 158, iss. 6, pp. 1189–1196. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08540.x>
 44. Warille A. A., Altun G., Elamin A. A., Kaplan A. A., Mohamed H., Yurt K. K., El Elhaj A., Skeptical approaches concerning the effect of exposure to electromagnetic fields on brain hormones and enzyme activities. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 2017, vol. 5, iss. 4, pp. 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.jmau.2017.09.002>
 45. Weiss N., Zamponi G. W. Control of low-threshold exocytosis by T-type calcium channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 2013, vol. 1828, iss. 7, pp. 1579–1586. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.07.031>
 46. Weiss N., Zamponi G. W. Genetic T-type calcium channelopathies. *Journal of Medical Genetics*, 2019, vol. 57, iss. 1, pp. 1–10. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106163>
 47. Xiang Z., Thompson A. D., Brogan J. T., Schulte M. L., Melancon B. J., Mi D., Lewis L. M., Zou B., Yang L., Morrison R., Santomango T., Byers F., Brewer K., Aldrich J. S., Yu H., Dawson E. S., Li M., McManus O., Jones C. K., Daniels J. S., Hopkins C. R., Xie X. S., Conn P. J., Weaver C. D., Lindsley C. W. The discovery and characterization of ML218: A novel, centrally active T-type calcium channel inhibitor with robust effects in STN neurons and in a rodent model of Parkinson's disease. *ACS Chemical Neuroscience*, 2011, vol. 2, iss. 12, pp. 730–742. <https://doi.org/10.1021/cn200090z>
 48. Zalata A., El-Samanoudy A. Z., Shaalan D., El-Baiomy Y., Mostafa T. *In vitro* effect of cell phone radiation on motility, DNA fragmentation, and clusterin gene expression in human sperm. *International Journal of Fertility and Sterility*, 2015, vol. 9, iss. 1, pp. 129–136. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2015.4217>

EFFECTS OF LOW FREQUENCY RECTANGULAR ELECTRIC PULSES ON *TRICHOPLAX* (PLACOZOA)

A. V. Kuznetsov^{1,3}, O. N. Kuleshova¹, A. Yu. Pronozin², O. V. Krivenko¹, and O. S. Zavyalova³

¹A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation

²Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russian Federation

³Sevastopol State University, Sevastopol, Russian Federation

E-mail: kuznet61@gmail.com

The effect of extremely low frequency electric and magnetic fields (ELF-EMF) on plants and animals including humans is quite a contentious issue. Little is known about ELF-EMF effect on hydrobionts, too. We studied the effect of square voltage waves of various amplitude, duration, and duty cycle, passed through seawater, on *Trichoplax* organisms as a possible test laboratory model. Three Placozoa strains, such as *Trichoplax adhaerens* (H1), *Trichoplax* sp. (H2), and *Hoilungia hongkongensis* (H13), were used in experiments. They were picked at the stationary growth phase. Arduino Uno electronics platform was used to generate a sequence of rectangular pulses of given duration and duty cycle with a frequency up to 2 kHz. Average voltage up to 500 mV was regulated by voltage divider circuit. Amiloride, an inhibitor of calcium channel activity, was used to check the specificity of electrical pulse effect on voltage-gated calcium channels in *Trichoplax*. Experimental animals were investigated under

a stereo microscope and stimulated by current-carrying electrodes placed close to a *Trichoplax* body. Variations in behavior and morphological characteristics of *Trichoplax* plate were studied. Stimulating and suppressing effects were identified. Experimental observations were recorded using photo and video techniques. Motion trajectories of individual animals were tracked. Increasing voltage pulses with fixed frequency of 20 Hz caused H2 haplotype individuals to leave “electrode zone” within several minutes at a voltage of 25 mV. They lost mobility in proportion to voltage rise and were paralyzed at a voltage of 500 mV. Therefore, a voltage of 50 mV was used in further experiments. An animal had more chance to move in various directions in experiments with two electrodes located on one side instead of both sides of *Trichoplax*. Direction of motion was used as a characteristic feature. *Trichoplax* were observed to migrate to areas with low density of electric field lines, which are far from electrodes or behind them. Animals from old culture were less sensitive to electrical stimulus. H2 strain was more reactive than H1 strain and especially than H13 strain; it demonstrated stronger physiological responses at frequencies of 2 Hz and 2 kHz with a voltage of 50 mV. Motion patterns and animal morphology depended on the duration of rectangular stimulation pulses, their number, amplitude, and frequency. Effects observed varied over a wide range: from direct or stochastic migration of animals to the anode or the cathode or away from it to their immobility, an increase of optical density around and in the middle of *Trichoplax* plate, and finally to *Trichoplax* folding and detach from the substrate. Additional experiments on *Trichoplax* sp. H2 with pulse duration of 35 ms and pulse delay of 1 ms to 10 s showed that the fraction of paralyzed animals increased up to 80 % with minimum delay. Nevertheless, in the presence of amlodipine with a concentration of 25 nM, almost all *Trichoplax* remained fast-moving for several minutes despite exposure to voltage waves. Experimental animals showed a total discoordination of motion and could not leave an “electrode trap”, when amlodipine with a concentration of 250 nM was used. Further, *Trichoplax* plate became rigid, which appeared in animal shape invariability during motion. Finally, amlodipine with a concentration of 50 μ M caused a rapid folding of animal plate-like body into a pan in the ventral-dorsal direction and subsequent dissociation of *Trichoplax* plate into individual cells. In general, the electrical exposure applied demonstrated a cumulative but a reversible physiological effect, which, as expected, is associated with activity of voltage-gated calcium channels. Amlodipine at high concentration (50 μ M) caused *Trichoplax* disintegration; at moderate concentration (250 nM), it disrupted the propagation of activation waves that led to discoordination of animal motion; at low concentration (25 nM), it prevented an electric shock.

Keywords: rectangular electric pulses, *Trichoplax*, Placozoa, voltage-gated calcium channels

UDC 591.148:574.583(262.5)

INFLUENCE OF INVADER CTENOPHORES ON BIOLUMINESCENCE VARIABILITY OFF THE COAST OF WESTERN CRIMEA

© 2020 A. V. Melnik, V. V. Melnikov, L. A. Melnik, and O. V. Mashukova

A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation
E-mail: melnikalexsand@gmail.com

Received by the Editor 21.11.2019; after revision 26.03.2020;
accepted for publication 26.06.2020; published online 30.06.2020.

In the second half of the XX century, Black Sea ecosystem has undergone significant changes: a number of storm winds and upwellings decreased, precipitation abundance increased, coastal waters salinity decreased, temperature increased; moreover, ctenophores invaded. As a result, in the late 1980s, Black Sea pelagic ecosystem abruptly got restructured. This research is based on the studies performed in 1965–1966 and 2007–2012 near Sevastopol (Western Crimea) using the remote sensing data. Analysis of satellite data over the past 20 years showed the presence of positive dynamics in surface water temperature in Sevastopol water area. In the mid-1960s, the annual bioluminescence was characterized by seasonal peaks of dinophytes luminescence. In recent years, this rhythm has changed due to ctenophores invasion. The increase in *Mnemiopsis leidyi* abundance leads to a decrease in bioluminescence of luminous microalgae being consumed by these ctenophores. Due to *Beroe ovata* invasion and reproduction, *M. leidyi* biomass decreased; as a result, bioluminescence increased.

Keywords: Black Sea, bioluminescence, ctenophores, salinity, monitoring

Biophysical studies in the Black Sea began in the 1960s when D. Sc. E. Bityukov (IBSS) made the first annual measurements of bioluminescence in Sevastopol area [2]. Thus, in 1965–1966, 18 expeditions were carried out for instrumental measurements, and 72 net samplings of plankton were taken. Continuation of these works was initiated by D. Sc. Yu. Tokarev (IBSS); the studies were carried out in 2008–2015. So, it became possible to evaluate the long-term changes of coastal water bioluminescence under conditions of climate changes.

The climate changes in Black Sea ecosystem have led to the invasion of huge number of new luminous species: they were brought in with ballast waters from other regions. Therefore, all past experience and knowledge about Black Sea bioluminescence are subject to minor adjustments.

Before ctenophores invasion, bioluminescence field in Black Sea photic layer was formed by luminous dinoflagellates [4]. In the early 1980s, ctenophore *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865 invaded the Black Sea, which led to a significant reduction in plankton base and fish food [18]. In the late 1990s, another ctenophore, *Beroe ovata* Mayer, 1912, invaded the Black Sea and began to consume *Mnemiopsis leidyi* [6]. Now, the system is balanced: when the number of one species increases, the number of other species decreases. Therefore, it was suggested that these invader species should make a significant contribution to changing the seasonal dynamics of coastal water bioluminescence.

The aim of this work is to determine influence of these two species on the seasonal dynamics of coastal water bioluminescence.

MATERIAL AND METHODS

The fieldwork was carried out at the 10-mile station off the Kruglaya Bay (No. 1) and at two stations in the Sevastopol Bay (No. 2 and 3) (Western Crimea) (Fig. 1). The research was based on the real-time instrumental measurements of bioluminescence amplitude-frequency parameters, as well as on the determination of their spatial conjugacy with biological and hydrophysical characteristics of water masses.

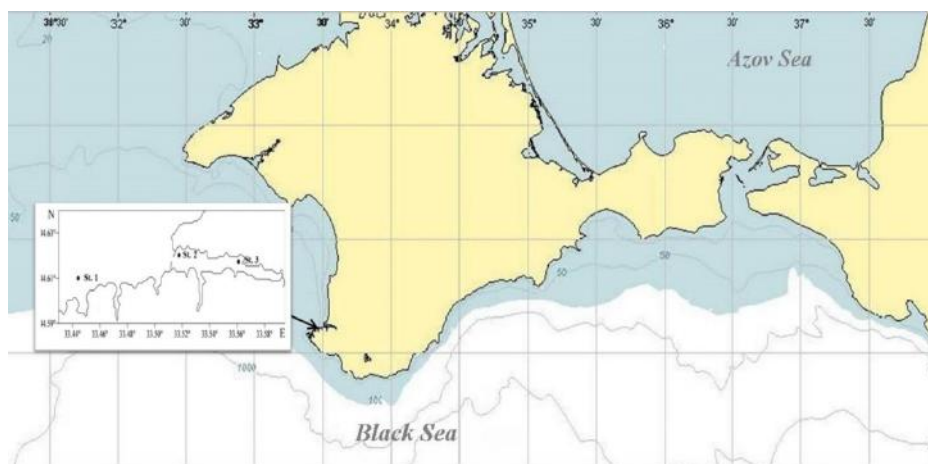


Fig. 1. Map of stations

Рис. 1. Карта станций

Station No. 1, located near the Kruglaya Bay (depth of 60 m), has water exchange with the open sea and is characterized by a fairly stable stratification of water column, which determines the vertical structure of temperature and salinity. Stations No. 2 and 3 are located in the Sevastopol Bay, and water exchange with the open sea is limited. In addition, the Sevastopol Bay includes the mouth of the Chernaya River, which is the flow of fresh water into the bay; this results in mixing of river water and seawater [15]. Depending on the volume of river flow, the impact of fresh water extends to different zones of the bay, which significantly affects region ecological conditions. Water area of Konstantinovskaya Bay (station No. 2, depth of 19 m) is relatively clean. Gollandiya Bay (station No. 3, depth of 18 m) is located in the central part of the Sevastopol Bay in the zone of active mixing of river water and seawater [8].

Bioluminescence intensity and background parameters were recorded using a submersible complex “Salpa-M” [21]. It allows taking simultaneous measurements of bioluminescent potential, temperature, hydrostatic pressure, turbidity, and photosynthetically active radiation. “Salpa-M” has four rows of blackened impellers, consisting of two groups of rows mutually perpendicular to attack angles and forming a moving light trap. This ensures the attenuation of light energy by $2 \cdot 10^7$ times, which is especially important during the daytime. The weight of the submersible complex does not exceed 15 kg; it is designed for autonomous power supply of 24 V.

Discreteness of the measurements during the “down” operation at a speed of $1.2 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ was about 0.25 m. To construct graphs of vertical profiles, the data were integrated up to 1 m. The method of collecting and processing the data using the “Salpa-M” complex was previously described in details [21]. On processing its data, profiles of bioluminescence, temperature, salinity, and conditional density of water were calculated. Results of the measurements were processed and added to a database [13].

Simultaneously with measurements with the “Salpa-M” complex, phytoplankton samples were taken using a bathometer. The fieldwork was carried out both at night (the period of maximum bioluminescence) and at daytime (the period of minimum bioluminescence). At each station, measurement with the “Salpa-M” complex was carried out twice. During several cruises of RV “Professor Vodyanitsky”, 10 to 30 continuous soundings were made by the “Salpa-M” complex at station No. 1.

Changes in sea surface temperature (hereinafter SST) in Sevastopol area were analyzed for 2008–2017 based on the analysis of remote sensing data. Under the conditions of a sea expedition, methodological approaches described in this article were tested, which will be applied in the scientific researches in the Antarctic region.

RESULTS

Mean annual SST values ($^{\circ}\text{C}$) have a negative trend since 1982 reaching its minimum in 1987; then, the period until 2017 is characterized by a significant positive trend (Fig. 2). Since trend lines were constructed by least squares calculation, the accuracy of the approximation was estimated by the coefficient of determination. This graph clearly shows that during the period of ctenophores invasion in the area studied, substantial warming of surface waters occurred.

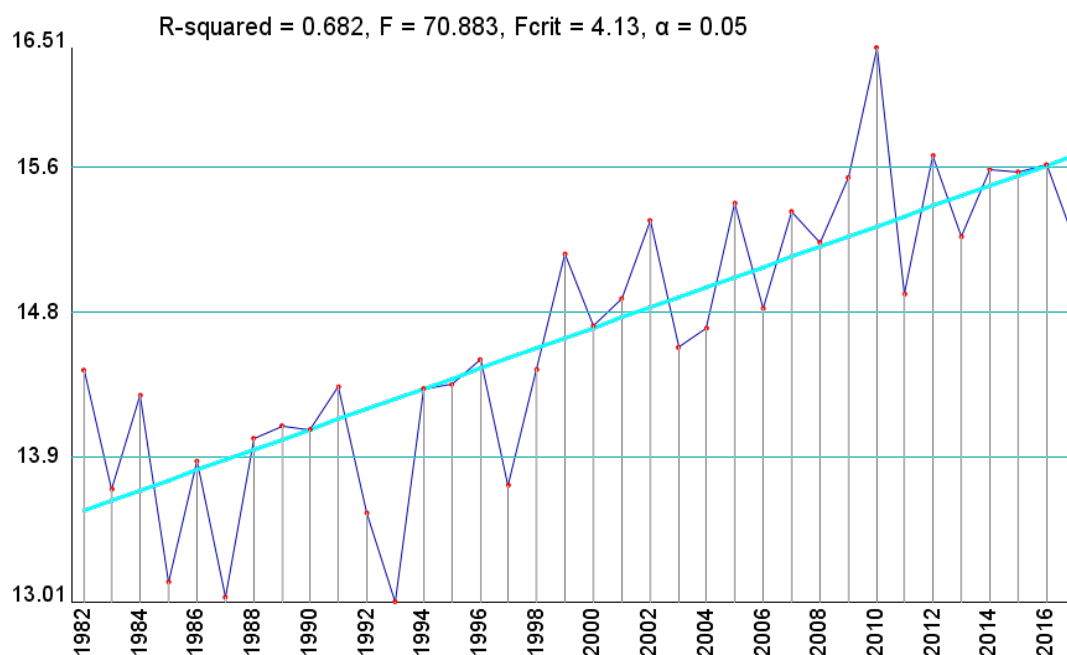


Fig. 2. Mean annual sea surface temperature values ($^{\circ}\text{C}$) calculated for 1982–2017 with a spatial resolution of 0.0417° in latitude and longitude. R -squared (R^2) is the coefficient of determination; F is Fisher's F -test; F_{crit} is the critical value of Fisher's F -test for the data considered at the accepted confidence probability α [14]

Рис. 2. Среднегодовые значения температуры поверхности моря ($^{\circ}\text{C}$), рассчитанные для 1982–2017 гг. с пространственным разрешением $0,0417^{\circ}$ по широте и долготе. R -squared (R^2) — коэффициент детерминации; F — F -критерий Фишера; F_{crit} — критическое значение F -критерия Фишера для данных, рассматриваемых при принятой доверительной вероятности α [14]

Data analysis showed that in 1965–1966, two seasonal peaks of bioluminescence were observed (Fig. 3A), which were associated with spring and autumn phytoplankton blooming [5]. In recent years, global warming has changed this rhythm. Thus, in 2008–2012, the seasonal dynamics of bioluminescence on Sevastopol coast was characterized by the appearance of additional peaks in the warm season, associated with the outbreaks of warm-water invader ctenophores – *M. leidyi* and *B. ovata* (Fig. 3A). Under favorable conditions, abrupt outbreaks of *B. ovata* abundance are possible, often alternating with recessions up to its complete disappearance (this, for example, is typical of North America coast [11]). It resulted in significant imbalance in the seasonal dynamics of the coastal water bioluminescence near Sevastopol.

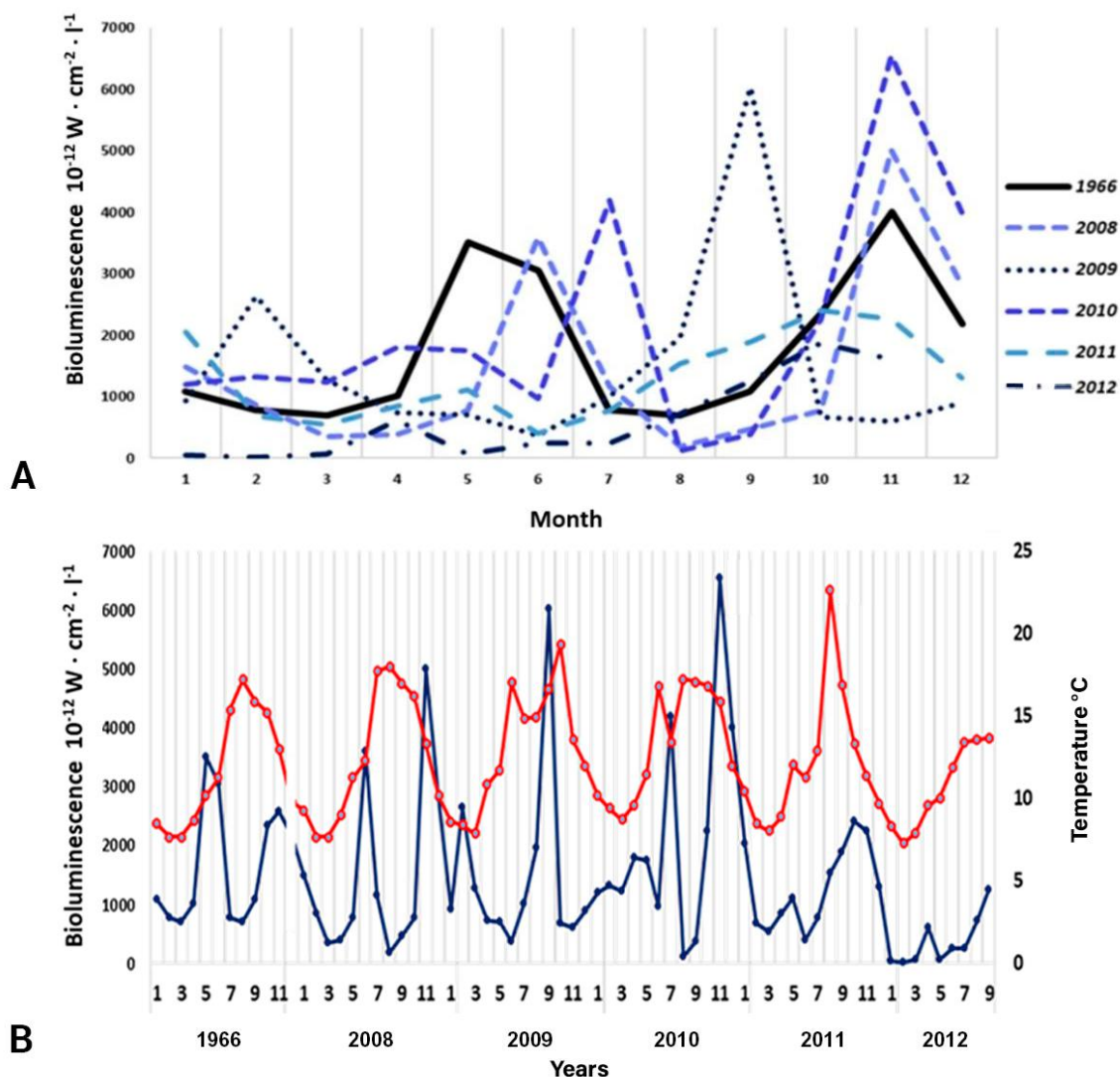


Fig. 3. A – seasonal dynamics of bioluminescence intensity; B – inter-annual dynamics of bioluminescence (mean values are indicated by a blue line) and water temperature (red line) in Sevastopol coastal waters in 55-m layer (1966, 2008–2012)

Рис. 3. А — сезонная динамика интенсивности биолюминесценции; В — межгодовая динамика биолюминесценции (средние значения — синяя линия) и температуры воды (красная линия) в прибрежных водах Севастополя в 55-метровом слое (1966, 2008–2012)

The inter-annual dynamics of temperature and bioluminescence (Fig. 3B, Table 1) was characterized by the presence of a positive annual mean trend – an increase in mean values of water temperature in 0–55-m layer from +12.11 °C (2008) to +12.89 °C (2010). The maximum summer values of the mean temperature increased from +18.00 °C (August 2008) to +22.62 °C (August 2011).

The peaks of bioluminescence (Fig. 3B) were observed in June 2008 ($3594 \cdot 10^{-12} \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{L}^{-1}$), in July 2009 ($4200 \cdot 10^{-12} \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{L}^{-1}$), and in September 2009 ($6029 \cdot 10^{-12} \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{L}^{-1}$), as well as in spring and autumn regularly due to phytoplankton blooming (Table 1).

The vertical structure of bioluminescence in all the seasons was determined by hydrological conditions, especially thermocline layer location. Bioluminescence is mainly represented by a structure of two maxima separated by a water column where bioluminescence is reduced. The upper stationary layer was almost always observed at a depth of 0–6 m; the lower layer with a higher luminosity migrated within 15–64 m and was located in thermocline area.

Table 1. Mean values of water temperature (T, °C) and bioluminescence (B, $\cdot 10^{-12}$ W \cdot cm $^{-2}$ ·L $^{-1}$) at station No. 1 (I–XII indicate months January till December)**Таблица 1.** Средние значения показателей температуры воды (T, °C) и биолюминесценции (B, $\cdot 10^{-12}$ Вт·см $^{-2}$ ·л $^{-1}$) на станции № 1 (I–XII — месяцы с января по декабрь)

Year	1966		2008		2009		2010		2011		2012	
Index	T	B	T	B	T	B	T	B	T	B	T	B
I	8.5	1094	9.3		8.62	929	10.16	1204	10.45	2048	8.35	42
II	7.7	781	7.7	859	8.38	2643	9.42	1326	8.5	691	7.29	17
III	7.7	703	7.7	352	7.9	1274	8.72	1233	8.07	544	7.94	68
IV	8.7	1016	9.0	391	10.84	733	9.62	1801	8.92	850	9.58	618
V	10.2	3516	11.3	781	11.75	700	11.48	1754	12.04	1104	10.06	76
VI	11.3	3047	12.3	3594	17.03	371	16.81	974	11.27	412	11.88	249
VII	15.4	781	17.7	1172	14.9	1011	13.43	4200	12.89	772	13.46	248
VIII	17.2	703	18.0	195	14.91	1970	17.24	126	22.62	1534		
IX	15.9	1094	17.0	469	16.62	6029	17.07	386	16.92	1898	13.71	1254
X	15.2	2344	16.2	781	19.36	675	16.81	2257	13.30	2410		
XI	13.0	2574	13.3	5000	13.57	608	15.87	6545	11.37	2256		
XII	9.8	2188	10.2	2813	12.00	900	12.00	4000	9.70	1304		

Studies of the inter-annual dynamics of invader ctenophores abundance near Sevastopol in 2009–2010 [1] showed that seasonal peaks for *M. leidyi* and *B. ovata* do not coincide (Fig. 3) due to differences in diets of these species. Increase in *B. ovata* abundance leads to decrease in *M. leidyi* abundance, which restores the number of luminous dinoflagellates. Recently it has been found out [20] that even *M. leidyi* larvae and post-larvae are likely to consume significant amounts of microphyto- and zooplankton including dinoflagellates, ciliated infusoria, and other flagellates.

B. ovata is the main consumer of *M. leidyi* in the Black Sea. Peaks of its seasonal abundance occur at the end of summer, when *M. leidyi* biomass reaches its maximum value. After density of food resource reduces, *Beroe* populations continue to persist due to a decrease in the mean body size of individuals [12].

Using the statistical analysis (Pearson's correlation coefficient, r) on the data on invader ctenophore abundance and bioluminescence dynamics showed that correlation between *M. leidyi* traits studied and the bioluminescence is low (-0.49) (Figs 4, 5). Correlation between *B. ovata* traits studied and the bioluminescence was assessed as strong (0.71). It can be concluded that in cases of $r = -0.49$, the increase in *M. leidyi* biomass moderately affects the decrease in bioluminescence intensity. In cases of $r = 0.71$, the increase in *B. ovata* biomass significantly affects the increase in bioluminescence intensity. Correlation between these data was measured by the Chaddock scale. Criteria for evaluation were as follows: $0.1 < r < 0.3$ (weak); $0.3 < r < 0.5$ (moderate); $0.5 < r < 0.7$ (noticeable); $0.7 < r < 0.9$ (strong); $0.9 < r < 1$ (very strong).

DISCUSSION

Because of the global warming, intensive distribution and development of gelatinous plankton has occurred in various marine areas of the world in recent decades. Significant secular trends of increasing air temperature (by 0.4 – 0.8 °C per 100 years) are observed along Black Sea coast, which corresponds to global warming estimates [9]. During the second half of the XX century, the recurrence of strong winds and upwellings decreased three times; a significant increase in precipitation and a decrease in evaporation were observed [10 ; 14]. This created the conditions for the resettlement of invader species, which have radically changed Black Sea ecosystem.

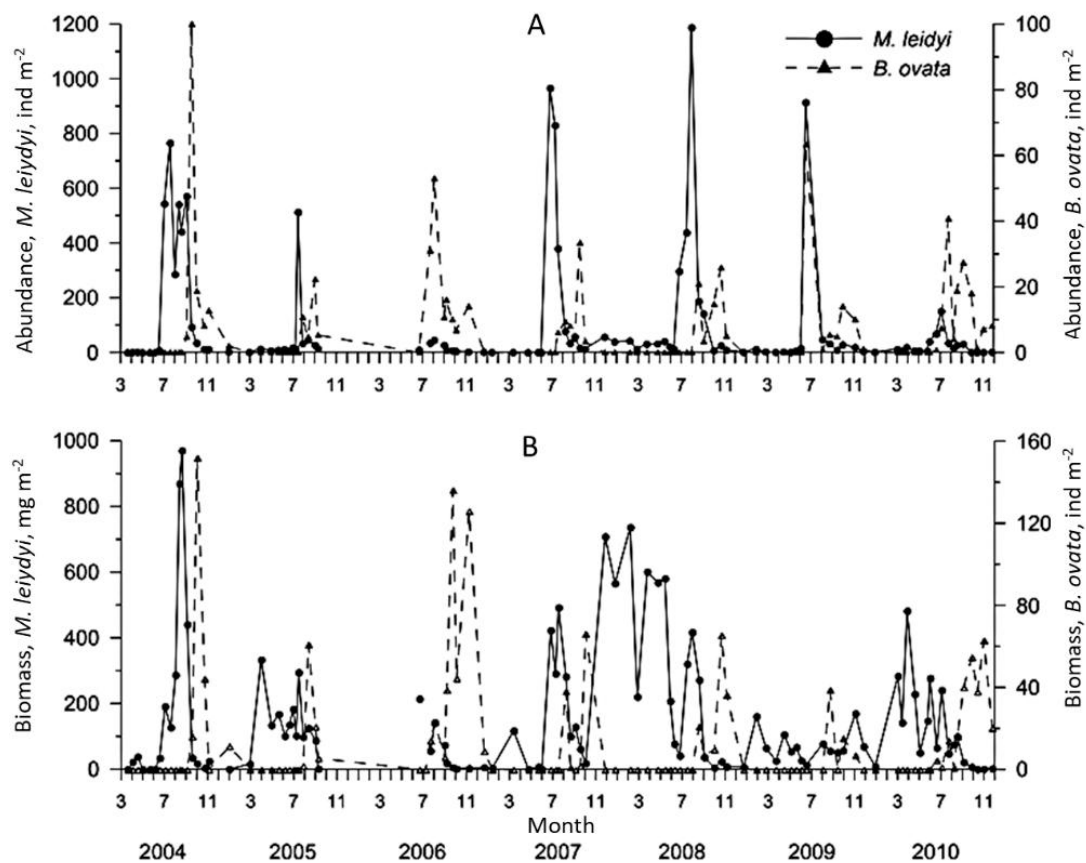


Fig. 4. Inter-annual dynamics of *Mnemiopsis leidyi* and *Beroe ovata* abundance (A) and biomass (B) [1]

Рис. 4. Межгодовая динамика численности (A) и биомассы (B) *Mnemiopsis leidyi* и *Beroe ovata* [1]

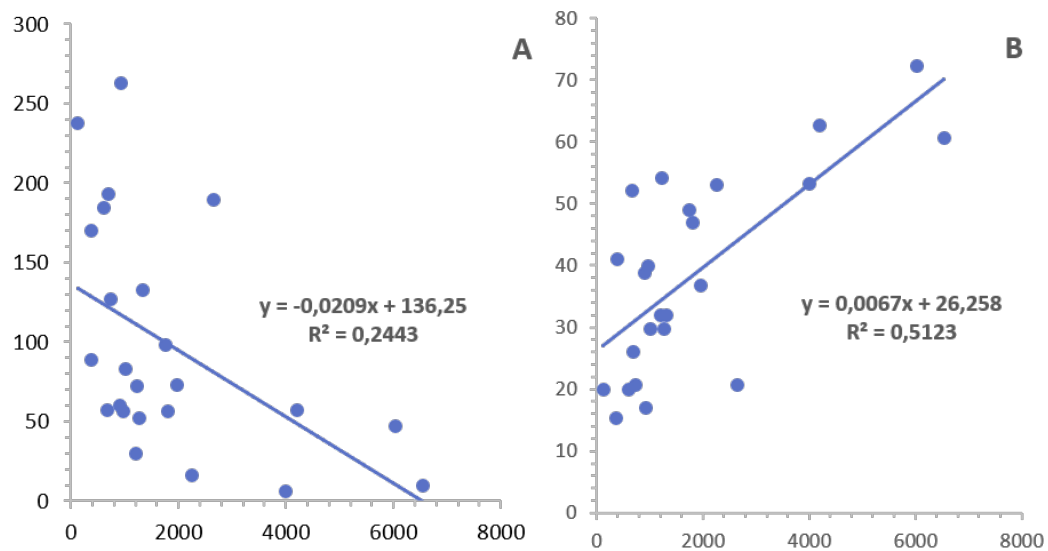


Fig. 5. Dependence of bioluminescence on ctenophores biomass: A – *Mnemiopsis leidyi*; B – *Beroe ovata* (for 0–10-m layer)

Рис. 5. Зависимость биолюминесценции от биомассы гребневиков: А — *Mnemiopsis leidyi*; В — *Beroe ovata* (для слоя 0–10 м)

In the Black Sea, warm-water ctenophores appeared about 40 years ago [17 ; 18], as well as in the Sea of Azov [12] and the Caspian Sea [19]. Everywhere, *M. leidy* invasion led to catastrophic changes in marine ecosystems [23]. For a decade, due to the absence of natural predators, *M. leidy* development in the Black Sea was controlled only by temperature and food availability [7]. In 1997, its consumer, new carnivorous ctenophore *B. ovata*, was firstly discovered in the Black Sea; in 1999 and 2000, *Mnemiopsis* population density began to decline rapidly due to *Beroe* mass development [22]. Before the invasion of this predatory ctenophore, *Mnemiopsis* had abundance peaks in warm season. Now, in the summertime, the second minimum of its abundance is formed, due to *B. ovata* intensive development.

Till now, there are practically no studies on the effect of these invaders on the overall variability of Black Sea bioluminescence. Prior to their invasion, the total luminosity of coastal waters was determined by seasonal peaks of dinoflagellates development [2 ; 3 ; 4 ; 5]. Invader ctenophores do not only actively luminesce on their own, but also have a decisive influence on species composition and abundance of other bioluminescents.

According to the results of the detailed study of the long-term variability of bioluminescence in 2009–2012 in the research area [16], seawater luminescence in winter occurs due to the development of microalgae *Ceratium fusus* Ehrenb., *C. tripos* Ehrenb., *C. furca* Ehrenb., *Protoperidinium divergens* (Ehrenb.) Balech, *P. crassipes* (Kof.) Balech, *P. pallidum* (Ostenf.) Balech, *P. depressum* (Bailey), and *Balech oblongum* (Auriv.) Parke & J. D. Dodge. The second peak of the development of microalgae, *Gonyaulax*, *Scrippsiella trochoidea* (F. Stein), *Scrippsiella* Balech ex A. R. Loeblich III, 1965, and *Lingulodinium polyedrum* (F. Stein) J. D. Dodge, was observed during the springtime. This study has shown that the seasonal variability of total bioluminescence occurs in spring and autumn till now, as it was observed in the 1970s. Meanwhile, now bioluminescence peaks are sometimes twice as high as they were 50 years ago. It is likely that, in addition to microalgae contribution, in certain seasons of the year, the total area of luminous water increases due to ctenophores bioluminescence contribution. The authors of the present study very often register rapid increases of bioluminescence level in areas of ctenophores swarms in Sevastopol coastal waters. However, the incompleteness of these data does not allow one to estimate direct ctenophores contribution to the total water luminosity. On the other hand, ctenophores abundance is not comparable with that of phytoplankton determining the total bioluminescence of coastal waters.

Thus, the results of this study showed that differences in food modes of ctenophores have a significant impact on the seasonal dynamics of the bioluminescence of Black Sea coastal waters. The invasion of a new predatory species has led to the emergence of a balance, that depends on the nature of regional climatic and seasonal changes in the aquatic environment.

This work was carried out within the framework of government research assignments of IBSS “Superposition of physical, chemical, and biological processes in the formation of the quality of the marine environment and the functional state of aquatic organisms in the Sea of Azov – Black Sea basin” (No. AAAA-A18-118020790154-2) and “Functional, metabolic, and toxicological aspects of the existence of hydrobionts and their populations in biotopes with different physical and chemical regimes” (No. AAAA-A18-118021490093-4) and partly supported by the grant of the Russian Foundation for Basic Research (No. 18-45-920015). Method development was carried out within the framework of the project “Comprehensive studies of the current state of the ecosystem of the Atlantic sector in the Antarctic” (No. AAAA-A19-119100290162-0).

Acknowledgement. We are grateful to M. Biryukova and L. Ereemeev for their invaluable contribution during this study. We would like to thank the anonymous reviewers for the constructive and useful comments that greatly contributed to improving the final version of the paper.

REFERENCES / СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abolmasova G. I., Finenko G. A., Romanova Z. A., Datsyk N. A., Anninsky B. E. State of gelatinous macrozooplankton in inshore waters off Crimean coast of the Black Sea in 2009–2010. *Morskoj ekologicheskij zhurnal*, 2012, vol. 11, no. 3, pp. 17–24. (in Russ.)
- Bitjukov E. P., Rybasov V. P., Shayda V. G. Annual variations of the bioluminescence field intensity in the neuritic zone of the Black Sea. *Okeanologiya*, 1967, vol. 7, no. 6, pp. 1089–1099. (in Russ.)
- Bitjukov E. P. Bioluminescentsiya *Noctiluca miliaris* v raznykh temperaturnykh usloviyakh. *Biologiya morya*, 1971, iss. 24, pp. 70–77. (in Russ.)
- Bitjukov E. P., Evstigneev P. V., Tokarev Yu. N. Luminescent Dinoflagellata of the Black Sea as affected by anthropogenic factors. *Gidrobiologicheskii zhurnal*, 1993, vol. 29, no. 4, pp. 27–34. (in Russ.)
- Bitjukov E. P., Vasilenko V. I., Serikova I. M., Tokarev Yu. N. Results and prospects of the bioluminescent investigation at the Black Sea. *Ekologiya morya*, 1996, iss. 45, pp. 19–24. (in Russ.)
- Datsyk N. A., Romanova Z. A., Finenko G. A., Abolmasova G. I., Anninskiy B. E. Zooplankton community structure in the inshore waters of the Crimean coasts (Sevastopol area) and trophic relations in the food chain zooplankton – *Mnemiopsis* in 2004–2008. *Morskoj ekologicheskij zhurnal*, 2012, vol. 11, no. 2, pp. 28–38. (in Russ.)
- Finenko G. A., Abolmasova G. I., Romanova Z. A., Datsyk N. A., Anninskiy B. E. Sovremennoe sostoyanie populyatsii grebnevikov *Mnemiopsis leidyi* kak pishchevykh konkurentov promyslovykh ryb v pribrezhnykh raionakh krymskogo poberezh'ya Chernogo morya. In: *Promyslovye biologicheskie resursy Chernogo i Azovskogo morey* / V. N. Eremeev, A. V. Gaevskaya, G. E. Shul'man, Yu. A. Zagorodnyaya (Eds). Sevastopol : ECOSI-Gidrofizika, 2011, chap. 9, pp. 271–276. (in Russ.)
- Ivanov V. A., Mikhailova E. N., Repetin L. N., Shapiro N. B. A model of the Sevastopol'skaya Bay. Reproduction of the vertical structure of temperature and salinity fields in 1997–1999. *Physical Oceanography*, 2003, vol. 13, iss. 4, pp. 201–222. <https://doi.org/10.1023/A:1025850016768>
- IPCC, 2007: *Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II, and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* / [Core Writing Team ; R. K. Pachauri, A. Reisinger (Eds)]. Geneva, Switzerland : IPCC, 2007, 104 p.
- Lipchenko A. E., Il'in Yu. P., Repetin L. I., Lipchenko M. M. Reduction of evaporation from the Black Sea surface in the second half of the XX century as consequence of the global climate change. In: *Ekologicheskaya bezopasnost' pribrezhnoi i shel'fovoi zon i kompleksnoe ispol'zovanie resursov shel'fa* : sbornik nauchnykh trudov. Sevastopol : EKOSI-Gidrofizika, 2006, iss. 14, pp. 449–461. (in Russ.)
- Luppova N. E. *Beroe ovata* Mayer, 1912 (Ctenophora, Atentaculata, Beroida) in the near-shore waters of the North-Eastern Black Sea. *Ekologiya morya*, 2002, iss. 59, pp. 23–25. (in Russ.)
- Luppova N. E. Abundance dynamics and population structure of the invasive ctenophore *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865 (Mnemiopsida, Tentaculata) in the coastal zone of the northeastern Black Sea. *Povolzhskii ekologicheskii zhurnal*, 2014, no. 4, pp. 537–543. (in Russ.)
- Melnikov V. V., Melnik A. V., Melnik L. A., Belogurova Yu. B., Zhuk V. F. Marine bioluminescence historical database. *Sistemy kontrolya okruzhayushchei sredy*, 2018, iss. 12 (32), pp. 44–51. (in Russ.)
- Melnik A. V., Melnikov V. V., Serebrennikov A. N., Melnik L. A., Mashukova O. V. Biooceanographic characteristics of the bioluminescence fields in the Sevastopol coastal waters: Results of long-term monitoring. *Sistemy kontrolya okruzhayushchei sredy*, 2019, iss. 1 (35), pp. 79–88. (in Russ.). <https://doi.org/10.33075/2220-5861-2019-1-79-87>
- Repetin L. N., Gordina A. D., Pavlova E. V., Romanov A. S., Ovsyanyi E. I. Affect of oceanographic factors upon the ecological state of the Sevastopol Bay (the Black Sea). *Morskoi gidrofizicheskii zhurnal*, 2003, no. 2, pp. 66–80. (in Russ.)
- Serikova I. M., Bryantseva Yu. V., Tokarev Yu. N., Stanichnyi S. V., Suslin V. V., Vasilenko V. I. Response of phytoplankton of the Sevastopol coastal zone to climate peculiarities of the years 2009–2012. *Gidrobiologicheskii zhurnal*, 2015, vol. 51, no. 5, pp. 40–51. (in Russ.)
- Shushkina E. A., Musayeva E. I., Anokhina L. L., Lukasheva T. A. The role of the gelatinous macroplankton jellyfish *Aurelia* and invading ctenophores *Mnemiopsis* and *Beroe* in the plankton communities of the Black Sea. *Okeanologiya*, 2000, vol. 40, no. 6, pp. 859–866. (in Russ.)

18. Shushkina E. A., Musaeva E. I. Structure of epipelagic zooplankton community and its changes related to the invasion of *Mnemiopsis leidyi* in the Black Sea. *Okeanologiya*, 1990, vol. 30, no. 2, pp. 306–310. (in Russ.)
19. Sokolskiy A. F., Kamakin A. M. Raspredelenie grebnevikov *Mnemiopsis* sp. v Kaspiiskom more v 2001 g. In: *Fisheries Researches in the Caspian : scientific-research works results for 2000*. Astrakhan : KaspNIIRKh Publ., 2001, pp. 105–110. (in Russ.)
20. Sullivan J., Gifford L. Diet of the larval ctenophore *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz (Ctenophora, Lobata). *Journal of Plankton Research*, 2004, vol. 26, iss. 4, pp. 417–431. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbh033>
21. Tokarev Yu. N., Vasilenko V. I., Zhuk V. F. Novyi gidrobiologicheskiy kompleks dlya ekspressnoi otsenki sostoyaniya pribrezhnykh ekosistem. In: *Sovremennye metody i sredstva okeanologicheskikh issledovaniy : materialy XI Mezhdunar. nauch.-tekhn. konf., Moscow, 25–27 Nov., 2009*. Moscow : Izd-vo RAN, 2009, pt. 3, pp. 23–27. (in Russ.)
22. Vinogradov M. E., Shushkina E. A., Anokhina L. L., Vostokov S. V., Kucheruk N. V., Lukasheva T. A. Massovoe razvitiye grebnevikov *Beroe ovata* u severo-vostochnogo poberezh'ya Chernogo morya. *Okeanologiya*, 2000, vol. 41, no. 1, pp. 52–55. (in Russ.)
23. Vinogradov M. E., Shushkina E. A., Vostokov S. V., Vereshchaka A. L., Lukasheva T. A. Population dynamics of the ctenophores *Mnemiopsis leidyi* and *Beroe ovata* near the Caucasus shore of the Black Sea. *Okeanologiya*, 2002, vol. 42, no. 5, pp. 693–701. (in Russ.)

ВЛИЯНИЕ ГРЕБНЕВИКОВ-ВСЕЛЕНЦЕВ НА ИЗМЕНЧИВОСТЬ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ У БЕРЕГОВ ЗАПАДНОГО КРЫМА

А. В. Мельник, В. В. Мельников, Л. А. Мельник, О. В. Машукова

Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,
Севастополь, Российская Федерация
E-mail: melnikalexsand@gmail.com

Во второй половине XX века произошли значительные изменения в экосистеме Чёрного моря. Так, число штормовых ветров и апвеллингов уменьшилось, осадки стали обильнее, солёность прибрежных вод снизилась, температура водных масс повысилась. Кроме того, произошло вселение гребневиков. В итоге в конце 1980-х гг. пелагическая экосистема Чёрного моря резко перестроилась. Данная работа основана на исследованиях, выполненных при помощи дистанционного зондирования в 1965–1966 и 2007–2012 гг. в районе г. Севастополя (Западный Крым). Анализ спутниковых данных за последние 20 лет показал наличие положительной динамики температуры поверхностных вод в акватории Севастополя. В середине 1960-х гг. годовая динамика биолюминесценции характеризовалась сезонными пиками свечения динофитовых микроводорослей. В последние годы этот ритм изменился из-за вселения гребневиков. Увеличение численности *Mnemiopsis leidyi* приводит к уменьшению биолюминесценции светящихся микроводорослей, которых этот гребневик потребляет. Вселение и размножение *Beroe ovata* обусловило резкое уменьшение биомассы *M. leidyi* и, как следствие, рост биолюминесценции.

Ключевые слова: Чёрное море, биолюминесценция, гребневик, солёность, мониторинг

УДК 574.64:582.261.1

ОЦЕНКА НЕОДНОРОДНОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК ПРИ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ С КЛОНЫМИ КУЛЬТУРАМИ БЕНТОСНЫХ ДИАТОМОВЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ

© 2020 г. А. Н. Петров, Е. Л. Неврова

Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,
Севастополь, Российская Федерация
E-mail: alexpet-14@mail.ru

Поступила в редакцию 17.09.2019; после доработки 23.04.2020;
принята к публикации 26.06.2020; опубликована онлайн 30.06.2020.

Увеличение антропогенной нагрузки на прибрежные акватории требует постоянного отслеживания состояния их экосистем. Удобными биоиндикаторами для опосредованной оценки качества морской среды служат донные диатомовые водоросли, являющиеся ключевым звеном морских прибрежных сообществ и обладающие высокой чувствительностью к влиянию экологических факторов. Изменение показателей развития микроводорослей под воздействием различных токсикантов может быть подходящим инструментом при мониторинге качества морской среды, однако научно-методические подходы использования бентосных диатомовых водорослей как тест-объектов остаются недостаточно разработанными. Одной из важных проблем является оценка достоверности выборок при подсчёте обилия клеток в сосудах на разных этапах токсикологического эксперимента. Цель работы — провести статистическую оценку достоверности равенства среднего исходного числа клеток инокулята клоновой культуры, вносимого в каждую из повторностей, а также достоверности равномерного распределения клеток по всей площади дна чашек Петри. Используются клоновые культуры трёх видов бентосных диатомовых водорослей — *Thalassiosira excentrica* Cleve, 1903 (Coscinodiscophyceae), *Ardissonea crystallina* (C. Agardh) Grunow, 1880 (Fragilariophyceae) и *Pleurosigma aestuarii* (Bréb. in Kütz.) W. Smith, 1853 (Bacillariophyceae). Эти виды относятся к разным классам Bacillariophyta и значительно различаются по морфологии панциря и образу жизни (парящие в водной массе, прикреплённые, подвижные). Статистическое сравнение вариативности числа клеток в эксперименте подтвердило отсутствие достоверных различий между средними значениями исследуемого параметра у всех видов при стандартном уровне значимости (0,05). Показано, что, несмотря на видоспецифические отличия в темпе приращения числа клеток, вариативность числа клеток в полях зрения микроскопа в ходе эксперимента меняется незакономерно. Наибольшая вариативность отмечена на 5-е сутки у мелкоразмерного вида *T. excentrica* ($Cv = 42...55\%$), а наименьшая — у крупноклеточного вида *A. crystallina* ($Cv = 27...31\%$). Установлено отсутствие достоверных различий в численности клеток между тремя повторностями (для каждого из видов) как при исходном внесении инокулята в чашки, так и в последующие дни опыта. Вывод справедлив для каждого из изученных видов диатомовых, что позволяет рассматривать все повторности как выборки одной совокупности и осреднять результаты, полученные на разных стадиях токсикологического эксперимента. Статистически доказана равномерность распределения клеток по дну экспериментальных чашек, которая не зависит от видовой принадлежности клеток и их абсолютной численности. Результаты позволяют надёжно оценивать изменения численности клеток тестируемых видов диатомовых водорослей на разных этапах эксперимента по выборкам, полученным на основе подсчёта клеток в ограниченном числе полей зрения.

Ключевые слова: токсикологический эксперимент, методика, статистическая оценка, Bacillariophyta, *Thalassiosira excentrica*, *Ardissonea crystallina*, *Pleurosigma aestuarii*, Чёрное море

В связи со значительной антропогенной нагрузкой на Чёрное море, особенно проявляющейся в прибрежных акваториях у берегов Крыма, необходимо отслеживать изменения состояния планктонных и бентосных сообществ. В качестве одного из наиболее подходящих объектов для биотестирования и биоиндикации широко применяют микроводоросли, в частности планктонные, по использованию которых имеются многочисленные методические разработки [3 ; 8 ; 12 ; 19].

Обширные литературные данные по изучению воздействия различных токсикантов на развитие микроводорослей преимущественно посвящены представителям Chlorophyta [10] и Cryptophyta [17 ; 25]. Между тем вклад данных отделов (23 и 2 вида соответственно) в донные микроальгоценозы Чёрного моря совсем незначителен, в отличие от вклада отдела Bacillariophyta (1094 вида и внутривидовых таксона) [13], представители которого составляют до 99 % численности и биомассы в микрофитобентосных сообществах Мирового океана [29]. Упомянутый факт указывает на недостаточный уровень знаний для получения всеобъемлющей картины воздействия токсикантов на сообщества микрофитобентоса.

Многие массовые виды донных диатомовых (Bacillariophyta), являясь важными структурными компонентами морских экосистем, характеризуются приуроченностью к определённым микробиотопам и высокой чувствительностью к влиянию неблагоприятных экологических факторов [14]. Это позволяет использовать диатомовые водоросли бентоса в качестве перспективных тест-объектов, параметры изменения физиологических показателей которых (удельная скорость роста, смертность, состояние хлоропластов) под воздействием различных поллютантов служат удобным инструментом при опосредованной оценке качества среды [3 ; 10 ; 12 ; 18 ; 24 ; 25 ; 27].

В рамках задач гидробиологического мониторинга прибрежных акваторий использование бентосных диатомовых в качестве тест-объектов является мало разработанной научно-методической проблемой [9 ; 23]. Её решение позволит получить новые экспериментальные данные о диапазонах толерантности разных видов морских диатомовых водорослей при воздействии модельных токсикантов (медный купорос, синтетические поверхностно-активные вещества, пестициды и пр.) в ходе подострых и хронических опытов [1 ; 10 ; 11 ; 24 ; 25]. Также возникнет возможность решения ряда вопросов методического характера, от чего зависит надёжность выводов по итогам токсикологических тестов [19].

Одной из основных методических проблем является проверка достоверности выборочных оценок при подсчёте обилия клеток в экспериментальных сосудах (чашки Петри в нашем случае) на разных этапах многодневного токсикологического эксперимента. На точность результатов могут влиять неодинаковое число клеток, которые исходно содержатся в дозированном объёме инокулята (1 мл), вводимого в начале каждого эксперимента в чашки Петри, а также вероятная неравномерность распределения клеток по дну чашек в последующие дни экспозиции.

Вследствие малых размеров и высокой численности диатомовых водорослей прямой тотальный учёт клеток в каждой чашке на разных этапах эксперимента нереален. Именно поэтому подсчёт числа клеток ведётся под микроскопом в конечном числе дискретных полей зрения известной площади, а затем полученные данные пересчитываются на всю площадь дна экспериментального сосуда. В случае такого непрямого подсчёта общей численности клеток в чашках итоговые результаты могут сильно варьировать, что способно привести к искажению выводов о степени воздействия токсиканта на изменение численности клеток. Указанные сложности определили необходимость проведения специального методического исследования, результаты которого могут быть использованы для оптимизации постановки токсикологических экспериментов с донными диатомовыми и обеспечить большую надёжность выводов при интерпретации полученных количественных данных.

Цель работы, проведённой с использованием клоновых культур трёх разных видов донных диатомовых водорослей, — проверить справедливость следующих методических гипотез на основе статистической оценки достоверности полученных результатов:

- 1) среднее число клеток инокулята клоновой культуры, вносимое в каждую чашку Петри в начале эксперимента, должно быть примерно равным, то есть исходные числа клеток в каждой из трёх повторностей, которые закладываются в каждой линии, не должны статистически различаться между собой;
- 2) распределение клеток в каждой чашке, контролируемое в ходе многократного подсчёта в полях зрения по всей площади дна, является сравнительно равномерным, то есть отсутствует статистически значимая пространственная неоднородность по численности клеток *in vitro*.

Возможная агрегированность распределения клеток при подсчёте определённого числа полей зрения (их суммарная площадь составляет не более 4–5 % всей площади дна чашки Петри) при пересчёте на общую площадь дна экспериментального сосуда может приводить к значительной переоценке (или недооценке) общего числа клеток и, соответственно, влиять на выводы о степени воздействия разных концентраций токсикантов и сроков экспозиции на итоговые изменения численности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объекты исследований. Для оценки распределения клеток в экспериментальных сосудах использованы три вида бентосных диатомовых водорослей: *Thalassiosira excentrica* Cleve, 1903 (Coscinodiscophyceae), *Ardissonea crystallina* (C. Agardh) Grunow, 1880 (Fragilariophyceae) и *Pleurosigma aestuarii* (Bréb. in Kütz.) W. Smith, 1853 (Bacillariophyceae). Выбор видов обусловлен следующими причинами: 1) значительные различия морфологии панциря (дисковидные, палочковидные, сигмоидные); 2) разный образ жизни (планктонные — парящие в водной массе, бентосные — прикрепленные к субстрату, подвижные — передвигающиеся по субстрату); 3) наличие или отсутствие способности образовывать колонии; 4) видоспецифическая скорость размножения, а следовательно, и предположительно разные характер распределения клеток по дну чашек и темп прироста численности в ходе длительного эксперимента; 5) принадлежность к трём разным таксономическим классам Bacillariophyta (в соответствии с использованной нами системой [28]). Сравнительная статистическая оценка характера распределения клеток, имеющих кардинальные различия в образе жизни, позволяет проверить объективность результатов при проведении в дальнейшем токсикологических экспериментов с использованием представителей разных классов Bacillariophyta.

По результатам молекулярно-генетических исследований и экспериментов по половому воспроизведению, систематическое положение вида *A. crystallina*, ранее перемещённого из класса Fragilariophyceae в класс Coscinodiscophyceae, поставлено под сомнение. Высказано предположение, что *Ardissonea* (и иные представители Toxariales) могут представлять уникальную эволюционную группу, обособленную от пеннатных диатомовых водорослей [22]. Учитывая то обстоятельство, что по форме панциря и способности к образованию пучковидных колоний, прикрепленных к субстрату, данный вид более схож с представителями Fragilariophyceae (к которым он и относился до недавнего времени), в целях нашего эксперимента мы рассматриваем *A. crystallina* именно в составе этого класса.

Выбранные виды диатомовых водорослей выделены в клоновые линии путём изолирования с помощью микропипетки и семикратной промывки одиночной клетки под бинокуляром МБС-10 при увеличении $\times 40$ [2 ; 5 ; 18].

Thalassiosira excentrica выделен из состава микрофитобентоса рыхлого субстрата, отобранного в бух. Ласпи в сентябре 2017 г. на глубине 9 м. Вид морской, бенто-планктонный, способен парить в толще воды или опускаться на дно, характеризуется массовой встречаемостью в сублитеральной зоне Чёрного моря; клетки образуют цепочковидные колонии из 4–6 особей, соединённых тонким прозрачным тяжем [13 ; 15]. Створки плоскоцилиндрические, диаметр диска 25 мкм*, высота 3 мкм (рис. 1А, D).

*Здесь и далее размеры клеток указаны на момент начала эксперимента.

Ardissonea crystallina выделен из состава фитоперифитона искусственного субстрата, отобранного в бух. Казачья в апреле 2018 г. на глубине 5 м. Вид морской, бентосный, часто встречается в прибрежных районах; клетки прикрепляются к поверхности субстрата, образуя пучковидные колонии из 4–30 особей [4 ; 13]. Створки узколинейные, длина 410 мкм, ширина 18 мкм (рис. 1В, Е).

Pleurosigma aestuarii выделен из состава микрофитобентоса каменистого субстрата, отобранного у мыса Айя в июле 2018 г. на глубине 3 м. Вид морской, бентосный, встречается в массе в черноморской сублиторали; клетки одиночные, подвижные, быстро перемещаются по поверхности субстрата [13 ; 16]. Створки узколанцетные, сигмовидно изогнутые на концах, длина 135 мкм, ширина 22,5 мкм (рис. 1С, F).

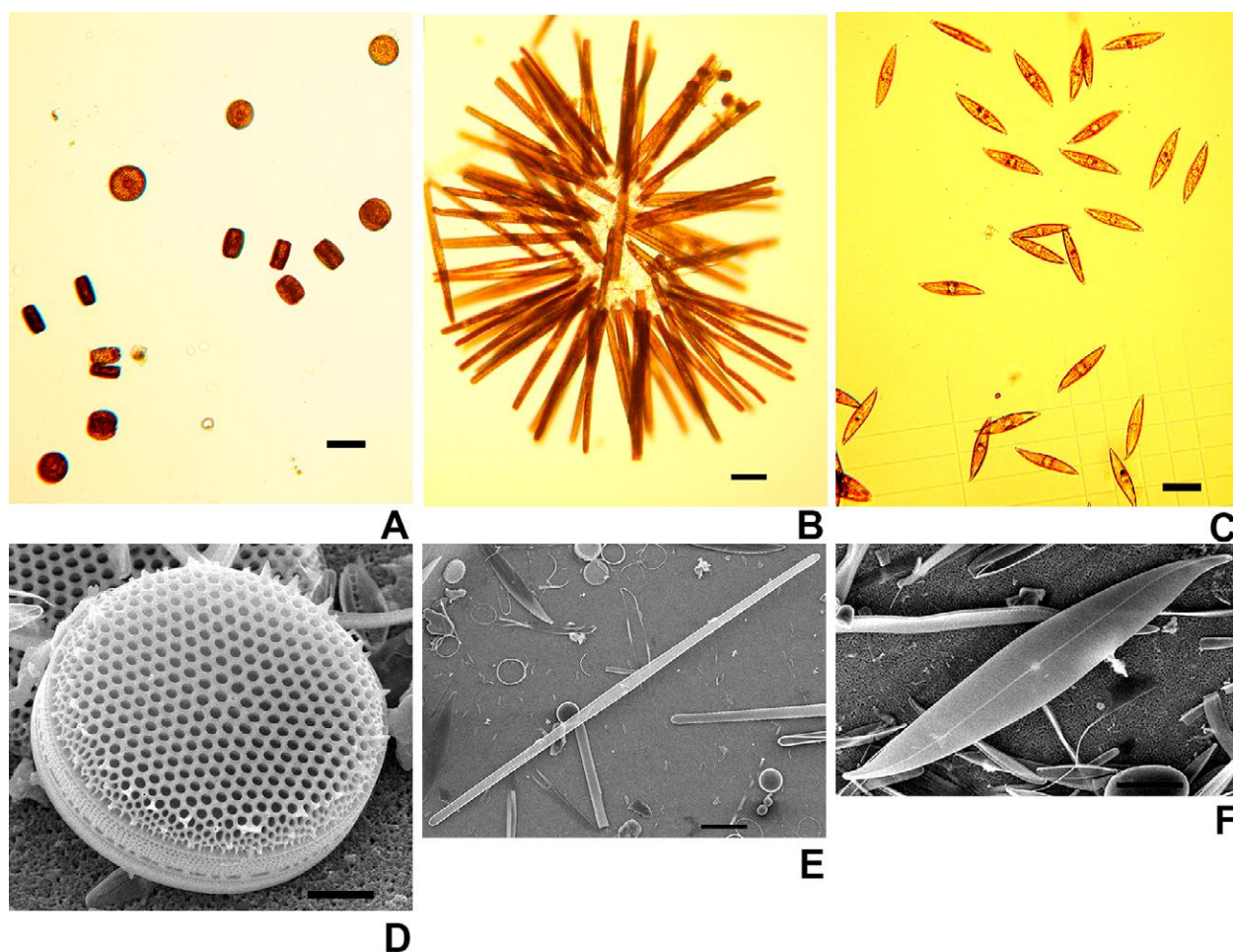


Рис. 1. Используемые в эксперименте виды бентосных диатомовых водорослей: А, D — *Thalassiosira excentrica*; В, Е — *Ardissonea crystallina*; С, F — *Pleurosigma aestuarii*. Световой микроскоп — А, В, С (масштабная линейка — 10 мкм); сканирующий электронный микроскоп — D (масштабная линейка — 5 мкм), Е (масштабная линейка — 50 мкм), F (масштабная линейка — 20 мкм)

Fig. 1. Benthic diatoms used in experiment: А, D – *Thalassiosira excentrica*; В, Е – *Ardissonea crystallina*; С, F – *Pleurosigma aestuarii*. Light microscope – А, В, С (scale bar = 10 μm); scanning electronic microscope – D (scale bar = 5 μm), Е (scale bar = 50 μm), F (scale bar = 20 μm)

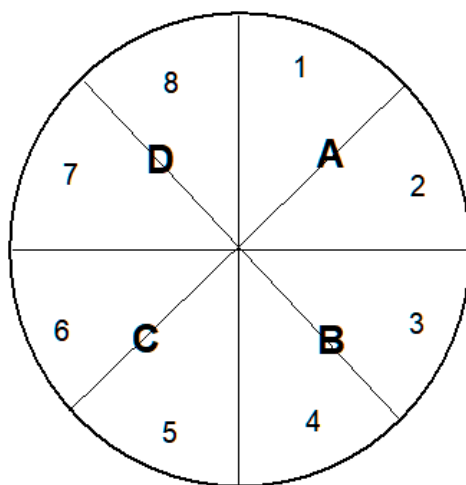
Содержание культур. Клоновые культуры содержали на питательной среде Гольдберг [7 ; 21], модифицированной для культивирования морских бентосных диатомовых, при постоянной температуре (22 ± 2) °С при рассеянном естественном освещении на северном окне лаборатории ФИЦ ИнБЮМ. Морскую воду для приготовления среды отбирали в 12-мильной зоне и фильтровали через фильтр 0,45 мкм, затем трижды пастеризовали при температуре +75 °С; далее в неё добавляли питательные вещества в соответствии с протоколом (табл. 1).

Таблица 1. Состав модифицированной среды Гольдберг на морской воде**Table 1.** Recipes for modified natural seawater media by Goldberg

№ раствора	Вещество	Количество вещества на 100 мл дистиллированной воды	Количество раствора на 1 л морской воды, мл
1	KNO_3	10,1 г	2,0
2	$NaH_2PO_4 \times 2H_2O$	1,421 г	0,5
3	$MnCl_2 \times 4H_2O$ $CoCl_2 \times 6H_2O$	0,01979 г 0,02379 г	1,0
4	$Na_2ЭДТА \times 2H_2O$ $FeCl_3 \times 6H_2O$	0,244 г 0,144 г	1,0
5	FeNH ₄ -цитрат	0,072 г	0,5
6	$Na_2SiO_3 \times 5H_2O$	1,5 г	2,0
7	Тиамин (витамин В ₁)	0,05 мг	0,5
8	Цианкобаламин (витамин В ₁₂)	0,5 мг	5,0

Схема эксперимента. В опыте с клоновыми культурами трёх видов диатомовых водорослей оценены возможные расхождения между тремя повторностями по среднему числу клеток в каждой чашке Петри через одни и пять суток экспозиции. Для каждого вида опыт проводили с использованием модифицированной питательной среды Гольдберг, без добавления токсиканта. В каждую из чашек (внутренний диаметр — 85 мм, площадь дна — около 5700 мм²) внесено по 30 мл питательной среды и по 1 мл инокулята клоновой культуры, после чего содержимое тщательно перемешано. Затем чашка загерметизирована пленкой Parafilm во избежание испарения жидкости.

Для контроля равномерности распределения случайных полей просмотра по всей площади дна чашки разделено линиями на 8 равных частей (рис. 2). В границах каждого сектора проведена фотофиксация 8–9 полей зрения, рандомизированно выбранных по площади дна, то есть в каждой чашке учтено по 64–72 поля. Микрофотографирование осуществлено под световым микроскопом Carl Zeiss Axiostar Plus с объективом Achroplan $\times 10$ с помощью цифровой камеры Canon PowerShot A640 (ФИЦ ИнБЮМ, г. Севастополь), а также под сканирующим электронным микроскопом JEOL JSM-6390LA (ЦКП Ботанического института имени В. Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург). Таксономическая идентификация видов проведена по определителям [6 ; 15 ; 16 ; 26].

**Рис. 2.** Оценка неравномерности распределения случайных полей просмотра по всей площади дна чашки Петри в эксперименте**Fig. 2.** Estimation of distribution heterogeneity of random viewing fields over the entire Petri dish bottom area in the experiment

Подсчёт клеток проводили по фотографиям каждого сектора. Площадь одного поля зрения составила около $4,0 \text{ мм}^2$, то есть в ходе просмотров суммарно просчитывали 4,5–4,9 % площади дна каждой чашки. При оценке равномерности распределения клеток диатомовых водорослей по дну чашек на разных этапах эксперимента сравнивали средние значения числа клеток в полях просмотра в 4 секторах дна чашек (A, B, C, D), при этом полученные ранее данные расчётов для полей зрения из восьми смежных частей объединяли попарно: 1 + 2, 3 + 4, 5 + 6 и 7 + 8. Указанные методические особенности связаны с тем, что абсолютная вариативность числа клеток при сравнении отдельных полей просмотра даже в пределах одного из восьми секторов могла быть значительной, особенно на 5-е сутки экспозиции. Так, например, для *A. crystallina* размах вариации составил от 16 до 41 клетки, для *T. excentrica* — $11 \div 48$, для *P. aestuarii* — $36 \div 91$. Коэффициент вариации при расчётах количества клеток в отдельных секторах, разделённых линиями, также мог достигать 70–78 %. При сравнительных расчётах по четырём секторам (A–D) с учётом объединённых данных из смежных частей дна чашек показатели вариативности числа клеток (дисперсия и стандартная ошибка) становились заметно ниже из-за учёта удвоенного числа измерений по каждой выборке. Для оценки степени расхождения между повторностями (чашками) рассчитывали статистическую достоверность парных различий средней численности клеток как между четырьмя секторами из одной чашки (то есть оценивали степень агрегированности клеток в пределах дна одной чашки), так и между секторами, относящимися к разным чашкам.

Поскольку исследованные виды диатомовых характеризуются разными темпами прироста числа клеток в ходе эксперимента, для корректной оценки статистических различий по средней численности рассчитывали скорость относительного приращения численности клеток (V) для всех исследованных видов по формуле [19 ; 20]:

$$V = (N_{(t+\Delta t)} - N_t) / (\Delta t \cdot N_t),$$

где N_t — средняя численность клеток в культуре в чашке Петри в момент времени t (1-е сутки эксперимента);

$N_{(t+\Delta t)}$ — средняя численность клеток в культуре в момент времени $t+\Delta t$ (5-е сутки);

Δt — период экспозиции (4 суток).

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка результатов экспериментов проведена с применением стандартных алгоритмов вариационного параметрического и рангового анализов, входящих в пакет статистических программ SigmaPlot 12.5 [30].

Нормальность распределения вариантов в выборке (число клеток в 64–72 полях просмотра в каждой чашке Петри) оценивали по критериям Шапиро — Уилка или Колмогорова — Смирнова с предварительным тестированием данных и исключением из расчётов резко выделяющихся значений (выбросов) в каждой выборке по методу квантилей. Такие агрегации с аномально высоким обилием клеток не являются итогом естественного нарастания их количества в ходе эксперимента, но иногда возникают либо вследствие исходного внесения дозатором в чашку Петри инокулята, в котором уже присутствуют соединённые полисахаридами агрегации клеток, либо в результате колебания содержимого чашки в ходе манипуляций при фотографировании.

Сравнение дисперсий трёх и более независимых выборок проведено по критерию Фишера (ANOVA), а также по ранговому критерию Краскела — Уоллеса (при отсутствии нормальности в распределении вариантов) для уровня значимости $P = 0,05$. Последующее сравнение у трёх видов диатомовых достоверности различий средних значений признака (среднее число клеток в случайных полях просмотра по четырём секторам чашек с учётом различных периодов экспозиции) выполнено на основе t -критерия Стьюдента (в случае нормальности распределения вариантов в выборках и равенства дисперсий). Для сравнения независимых выборок, в которых распределение вариантов отличалось от нормального, применены непараметрические критерии Холма — Шидака (для равных по объёму выборок) и Данна (при сравнении разноразмерных выборок) [30].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты анализа показали, что вариативность данных при подсчёте числа клеток в полях зрения может заметно различаться как при сравнении разных видов, так и у одного вида, но в разные периоды экспозиции (табл. 2).

Таблица 2. Вариационные характеристики для трёх видов донных диатомовых водорослей, отражающие особенности изменения средней численности клеток в чашках Петри (три повторности) на 1-е и 5-е сутки эксперимента

Table 2. Variation characteristics for three benthic diatom species reflecting the changes in mean cell number in Petri dishes (3 replicates) on the 1st and 5th days of the experiment

Вид	Повторность	1-е сутки			5-е сутки		
		n	$N \pm SE$	$Cv, \%$	n	$N \pm SE$	$Cv, \%$
<i>Ardissonea crystallina</i>	I	65	$6,16 \pm 0,41$	51,3	63	$22,70 \pm 0,82$	31,4
	II	63	$6,82 \pm 0,41$	44,8	62	$24,71 \pm 0,90$	32,2
	III	62	$6,79 \pm 0,42$	46,2	68	$24,65 \pm 0,76$	26,7
<i>Thalassiosira excentrica</i>	I	63	$9,19 \pm 0,39$	34,1	63	$20,68 \pm 1,42$	54,6
	II	64	$9,67 \pm 0,44$	37,3	63	$20,91 \pm 1,21$	46,1
	III	62	$11,45 \pm 0,41$	28,3	62	$24,00 \pm 1,26$	41,6
<i>Pleurosigma aestuarii</i>	I	65	$17,37 \pm 0,38$	29,6	72	$63,44 \pm 1,37$	22,3
	II	67	$18,55 \pm 0,54$	24,0	72	$60,78 \pm 1,71$	23,9
	III	72	$19,79 \pm 0,52$	22,8	72	$61,83 \pm 1,80$	24,7

Примечание: n — суммарное число просмотренных полей зрения в каждой чашке Петри за вычетом резко выделяющихся вариантов (выбросы); $N \pm SE$ — среднее число клеток \pm стандартная ошибка по выборке; Cv — коэффициент вариации.

Note: n – total number of examined viewing fields in each Petri dish minus the sharply distinguished values (statistical outliers); $N \pm SE$ – mean cells number \pm sampling standard error; Cv – coefficient of variation.

Возможные статистические различия в характере распределения диатомовых по дну чашки в разные периоды эксперимента могли быть вызваны тем, что в 1-е сутки распределение клеток в основном определялось тщательным механическим перемешиванием инокулята до и после его внесения в чашку, что теоретически обуславливало более равномерное распределение клеток в полях зрения. На 5-е сутки экспозиции характер распределения по дну чашки клеток диатомовых водорослей в основном определяется их индивидуальной двигательной активностью и склонностью к прикреплению и образованию агрегаций либо к пассивному парению в толще питательной среды. Перечисленные факторы могли оказывать влияние на неравномерность значений при учёте численности клеток в случайных полях зрения.

Наибольший коэффициент вариации отмечен в выборках *A. crystallina* в 1-е сутки эксперимента (45–51 %), а также в выборках *T. excentrica* на 5-е сутки (42–55 %). Следует учесть, что среднее число клеток в полях зрения у этих видов различалось в 3,5 раза. Высокая вариативность данных могла быть вызвана неравномерностью распределения клеток этих видов, когда наряду с одиночно расположенными клетками в полях зрения присутствуют и их агрегации, в которых клетки соединяются полисахаридными выделениями (*T. excentrica*) либо образуют пучковидные колонии (*A. crystallina*), прикреплённые к дну чашки в одной точке. В свою очередь, выборки клеток *P. aestuarii* в полях зрения характеризуются минимальной вариативностью (23–29 %) по параметру численности относительно периода экспозиции, что объясняется подвижностью клеток данного вида, свободно перемещающихся в ходе опыта по всему дну чашки, не концентрируясь в одной точке.

Результаты дисперсионного анализа для исследованных видов диатомовых показали, что дисперсии выборок при сравнении трёх повторностей не различаются: вероятность (P) принятия нуль-гипотезы много выше критической (0,05) и составляет 0,27–0,49 в 1-е сутки и 0,16–0,47 на 5-е сутки. Результаты попарного сравнения средних значений числа клеток в каждой чашке Петри (сравнение между повторностями) на разных стадиях эксперимента приведены в табл. 3.

Таблица 3. Результаты тестирования различий между средними значениями численности клеток в чашках Петри при попарном сравнении трёх повторностей для изученных видов диатомовых водорослей на разных этапах эксперимента

Table 3. Results of testing the differences between the mean cell numbers in Petri dishes under pairwise comparison of three replicates for diatom species at different stages of experiment

Вид	Пара повторностей	Среднее значение (1-е сутки)		<i>P</i>	Среднее значение (5-е сутки)		<i>P</i>
<i>Ardissonea crystallina</i>	I – II	6,16	6,82	0,252	22,70	24,71	0,090
	I – III	6,16	6,79	0,283	22,70	24,65	0,092
	II – III	6,82	6,79	0,951	24,71	24,65	0,747
<i>Thalassiosira excentrica</i>	I – II	9,19	9,67	0,416	20,68	20,91	0,906
	I – III	9,19	11,45	0,000	20,68	24,00	0,084
	II – III	9,67	11,45	0,003	20,91	24,00	0,080
<i>Pleurosigma aestuarii</i>	I – II	17,37	18,55	0,163	63,44	60,78	0,077
	I – III	17,37	19,79	0,001	63,44	61,83	0,200
	II – III	18,55	19,79	0,135	60,78	61,83	0,671

Примечание: *P* — вероятность справедливости нуль-гипотезы об отсутствии различий между средними значениями численности клеток в сравниваемых выборках ($P_{\alpha} = 0,05$). Статистически достоверно различающиеся результаты выделены жирным шрифтом.

Note: *P* – probability of acceptance of the null-hypothesis that there are no differences between the mean values of cell number in samples compared ($P_{\alpha} = 0.05$). Statistically significantly different results are indicated in bold.

Для *A. crystallina* все попарные различия по средней численности клеток между повторностями как в 1-е, так и на 5-е сутки экспозиции недостоверны ($P_{эксн} \gg 0,05$).

Для *T. excentrica* в 1-е сутки достоверные различия среднего числа клеток в полях зрения выявлены между парами повторностей I – III и II – III ($P_{эксн} \leq 0,003$). Между парой I – II различия недостоверны ($P_{эксн} = 0,416$). На 5-е сутки достоверные различия средних значений числа клеток между всеми парами повторностей отсутствуют.

Для *P. aestuarii* в 1-е сутки достоверные различия средних отсутствуют при попарном сравнении повторностей I – II и II – III. Только при сравнении пары I – III различия средних значений числа клеток достоверны ($P_{эксн} \leq 0,001$). На 5-е сутки достоверные различия средних значений числа клеток при сравнении всех повторностей отсутствуют ($P_{эксн} > 0,05$).

Скорость относительного приращения численности клеток в среднем была выше у *P. aestuarii* (0,59) и *T. excentrica* (0,40), чем у *A. crystallina* (0,37), что могло повлиять на показатели вариативности, хотя итоговые различия в численности клеток между повторностями эксперимента оказались недостоверны у обоих видов (см. табл. 3).

Таким образом, можно считать, что вариативность средней численности клеток у каждого вида в разных повторностях эксперимента в большинстве случаев не выходит за пределы статистической погрешности. Данный факт даёт основание рассматривать все повторности (случайные выборки клеток) как соответствующие одной исходно взятой совокупности (инокулят клеток каждого из видов) со сходным характером вариативности показателей.

Результаты оценки равномерности распределения числа клеток по четырём секторам дна чашек Петри показали следующее.

Первые сутки. Для всех изученных видов диатомовых водорослей не было выявлено статистически достоверных отличий ($P \gg 0,05$) между средними значениями параметра (число клеток в 16–18 полях просмотра) при попарном сравнении 12 секторов, то есть трёх повторностей (по четыре сектора в каждой чашке — А, В, С, D). Следовательно, на начальном этапе эксперимента распределение клеток по дну чашек статистически равномерно; заметных расхождений между чашками в результатах расчёта общего числа клеток по средним значениям из выборочных полей просмотра не происходит.

Пятые сутки. С учётом того, что распределение числа клеток в выборках во многих секторах отличается от нормального (тест Колмогорова — Смирнова: 0,125–0,210) и имеет достоверно разные дисперсии, тестирование достоверности возможных различий между секторами чашек проведено на основе ранговых критериев (тест Краскела — Уоллеса).

Ardissonea crystallina. Результаты 66 попарных ранговых сравнений среднего медианного значения числа клеток в каждом секторе дна чашки Петри показали отсутствие статистически значимых различий ($P_{эксн} = 0,067$) как между секторами дна одной чашки, так и между чашками (повторностями).

Thalassiosira excentrica. Результаты 66 попарных ранговых сравнений средних медианных значений числа клеток в каждом секторе свидетельствуют об отсутствии статистически достоверных различий ($P_{эксн} = 0,071$) как между секторами дна одной чашки, так и между чашками.

Pleurosigma aestuarii. При всех 66 попарных ранговых сравнениях 12 секторов из трёх повторностей только в парах секторов, где рассмотрены данные из сектора 1D (1D vs 2A; 1D vs 2B; 1D vs 3B), различия по среднему числу клеток были достоверны ($P_{эксн}$ 0,001; 0,003; 0,008 соответственно). Для остальных попарных ранговых сравнений медианных средних, выполненных по алгоритму Дана, различия между секторами были недостоверны ($P_{эксн} > 0,05$). В случае исключения из анализа сектора 1D, единственного с аномально высокой численностью клеток в полях просмотра, статистически достоверных различий как между секторами дна одной чашки, так и между чашками не выявлено ($P_{эксн} = 0,272$).

Полученные данные подтверждают статистическую равномерность распределения клеток бентосных диатомовых водорослей по дну экспериментальных сосудов даже в том случае, когда прямым визуальным подсчётом учтено не более 5 % дна чашки. Результаты сохраняют справедливость независимо от вида микроводорослей, их морфологического строения и образа жизни, а также отличий в значениях их абсолютной численности в чашках на разных стадиях эксперимента.

Заключение. Результаты статистического сравнения степени вариативности числа клеток в экспериментальных чашках у трёх изученных видов морских бентосных диатомовых водорослей, относящихся к трём разным классам Bacillariophyta (*Thalassiosira excentrica*, *Ardissonea crystallina* и *Pleurosigma aestuarii*), подтвердили, что в абсолютном большинстве случаев отсутствуют достоверные различия между средними значениями исследуемого параметра при стандартном уровне значимости (0,05). Показано, что, несмотря на видоспецифические различия в интенсивности нарастания численности клеток в ходе эксперимента, вариативность параметра меняется незакономерно. После 5-суточной экспозиции самая высокая вариативность числа клеток в полях зрения ($Cv = 42 \dots 55 \%$) отмечена у бентопланктонного мелкоразмерного вида *T. excentrica*, парящего в водной среде, а самая низкая ($Cv = 27 \dots 31 \%$) — у крупноклеточного *A. crystallina*, прикрепляющегося к дну чашки.

Установлено, что расчётная средняя численность клеток диатомовых между тремя повторностями достоверно не различается как на первые сутки после исходного введения в чашки инокулята, так и на заключительной стадии опыта. Вывод справедлив для всех видов диатомовых водорослей, использованных в качестве тест-объектов, что позволяет рассматривать все повторности как выборки одной совокупности и осреднять полученные по ним результаты на разных стадиях токсикологических экспериментов.

Статистически подтверждена равномерность распределения клеток в пределах дна экспериментальных чашек (даже при учёте не более чем 5 % площади дна). Равномерность распределения не является видоспецифичной и не зависит от абсолютной численности клеток в чашках. Полученные результаты позволяют статистически надёжно оценивать изменения численности клеток тестовых видов на разных этапах эксперимента по выборкам, полученным на основе подсчёта клеток в ограниченном числе полей зрения.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Закономерности формирования и антропогенная трансформация биоразнообразия и биоресурсов Азово-Черноморского бассейна и других районов Мирового океана» (№ гос. регистрации АААА-А18-118020890074-2).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Айздайчер Н. А., Реунова Ю. А. Влияние детергентов на рост диатомовой водоросли *Thalassiosira pseudonana* в культуре // *Биология моря*. 2002. Т. 28, № 5. С. 362–365. [Aizdaicher N. A., Reunova Yu. A. The effect of detergents on growth of the diatom *Thalassiosira pseudonana* in culture. *Biologiya morya*, 2002, vol. 28, no. 5, pp. 362–365. (in Russ.)]
2. Гайсина Л. А., Фазлутдинова А. И., Кабилов Р. Р. *Современные методы выделения и культивирования водорослей* : учебное пособие. Уфа : Изд-во БГПУ, 2008. 152 с. [Gaisina L. A., Fazlutdinova A. I., Kabirov R. R. *Sovremennye metody vydeleniya i kultivirovaniya vodoroslei* : учебное пособие. Ufa : Izd-vo BGPU, 2008, 152 p. (in Russ.)]
3. Гелашвили Д. Б., Безель В. С., Романова Е. Б., Безруков М. Е., Силкин А. А., Нижегородцев А. А. *Принципы и методы экологической токсикологии*. Нижний Новгород : Нижегородский госуниверситет, 2015. 142 с. [Gelashvili D. B., Bezel' V. S., Romanova E. B., Bezrukov M. E., Silkin A. A., Nizhegorodtsev A. A. *Printsipy i metody ekologicheskoi toksikologii*. Nizhniy Novgorod : Nizhegorodskii gosuniversitet, 2015, 142 p. (in Russ.)]
4. Гусяков Н. Е., Загордонцев О. А., Герасимюк В. П. *Атлас диатомовых водорослей бентоса северо-западной части Чёрного моря и прилегающих водоёмов*. Киев : Наукова думка, 1992. 115 с. [Guslyakov N. E., Zakordonets O. A., Gerasimyuk V. P. *Atlas diatomovykh vodoroslei bentosa severo-zapadnoi chasti Chernogo morya i prilgayushchikh vodoemov*. Kiev : Naukova dumka, 1992, 115 p. (in Russ.)]
5. Давидович Н. А., Давидович О. И., Подунай Ю. А. Коллекция культур диатомовых водорослей Карадагской научной станции (Крым) // *Морской биологический журнал*. 2017. Т. 2, № 1. С. 18–28. [Davidovich N. A., Davidovich O. I., Podunay Yu. A. Diatom culture collection of the Karadag scientific station (Crimea). *Morskoy biologicheskij zhurnal*, 2017, vol. 2, no. 1, pp. 18–28. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.21072/mbj.2017.02.1.03>
6. *Диатомовый анализ*. Кн. 3. *Определитель ископаемых и современных диатомовых водорослей. Порядок Pennales* / ред. А. И. Прошкина-Лавренко. Москва ; Ленинград : Госгеолитиздат, 1950. 398 с. [*Diatomovyi analiz*. Кн. 3. *Opre-delitel' iskopaemykh i sovremennykh diatomovykh vodoroslei. Poryadok Pennales* / A. I. Proshkina-Lavrenko (Ed.). Moscow ; Leningrad : Gosgeolitizdat, 1950, 398 p. (in Russ.)]
7. Кабанова Ю. Г. *Органический фосфор как источник питания фитопланктона* : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.18. Москва, 1958. 13 с. [Kabanova Yu. G. *Organicheskii fosfor kak istochnik pitaniya fitoplanktona* : avtoref. dis. ... kand. biol. nauk : 03.00.18. Moscow, 1958, 13 p. (in Russ.)]
8. Крайнюкова А. Н. Биотестирование и охрана вод от загрязнения // *Методы биотестирования вод*. Черноголовка : ГК ОП СССР, 1988. С. 4–21. [Krainyukova A. N. Biotestirovanie i okhrana vod ot zagryazneniya. In: *Metody biotestirovaniya vod*. Chernogolovka : GK OP SSSR, 1988, pp. 4–21. (in Russ.)]
9. Маркина Ж. В. *Применение микроводорослей для оценки качества морской воды и действия детергентов* : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.18 ; 03.00.16. Владивосток, 2008. 21 с. [Markina Zh. V. *Primenenie mikrovodoroslei dlya otsenki kachestva morskoi vody i deistviya detergentov* : avtoref. dis. ... kand. biol. nauk : 03.00.18 ; 03.00.16. Vladivostok, 2008, 21 p. (in Russ.)]
10. Маркина Ж. В. Действие детергентов и поверхностно-активных веществ на рост, физиологические и биохимические показатели одноклеточных водорослей (обзор). *Известия ТИНРО*. 2009. Т. 156. С. 125–134. [Markina Zh. V. Influence of detergents and surface-active substances on unicellular algae growth, physiological and biochemical parameters (review). *Izvestiya TINRO*, 2009, vol. 156, pp. 125–134. (in Russ.)]
11. Маркина Ж. В., Айздайчер Н. А. Влияние детергентов на динамику численности и физиологическое состояние бентосной микроводоросли *Attheya ussurensis* (Bacillariophyta) в культуре. *Биология моря*. 2007. Т. 33, № 6. С. 432–439. [Markina Zh. V., Aizdaicher N. A. The influence of detergents on the abundance dynamics and physiological state of the benthic microalgae *Attheya ussurensis* (Bacillariophyta) in laboratory culture. *Biologiya morya*, 2007, vol. 33, no. 6, pp. 432–439. (in Russ.)]
12. Маркина Ж. В., Айздайчер Н. А. Оценка качества вод Амурского залива Японского моря

- на основе биотестирования с применением одноклеточной водоросли *Pheodactylum tricornerutum* Bohlin // *Сибирский экологический журнал*. 2011. Т. 18, № 1. С. 99–105. [Markina Zh. V., Aizdaicher N. A. *Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin bioassay of water quality of Amur Bay (the Sea of Japan). *Sibirskii ekologicheskii zhurnal*, 2011, vol. 18, no. 1, pp. 99–105. (in Russ.)]
13. Неврова Е. Л. *Бентосные диатомовые водоросли (Bacillariophyta) Чёрного моря: разнообразие и структура таксоценов различных биотопов* : дис. ... докт. биол. наук. Москва, 2015. 445 с. [Nevrova E. L. *Bentosnye diatomovye vodorosli (Bacillariophyta) Chernogo morya: raznobrazie i struktura taksotsenov razlichnykh biotopov*. [dissertation]. Moscow, 2015, 445 p. (in Russ.)]. <https://dlib.rsl.ru/01005555099>
 14. Неврова Е. Л., Снигирева А. А., Петров А. Н., Ковалева Г. В. *Руководство по изучению морского микрофитобентоса и его применению для контроля качества среды / под ред. А. В. Гаевской*. Севастополь ; Симферополь : Н. Орианда, 2015. 176 с. [Nevrova E. L., Snigireva A. A., Petrov A. N., Kovaleva G. V. *Guidelines From Quality Control of the Black Sea. Microphytobenthos / A. V. Gaevskaya (Ed.)*. Sevastopol ; Simferopol : N. Orianda, 2015, 176 p. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.21072/978-5-9907290-2-5>
 15. Прошкина-Лавренко А. И. *Диатомовые водоросли планктона Чёрного моря*. Москва ; Ленинград : Изд-во АН СССР, 1955. 222 с. [Proshkina-Lavrenko A. I. *Diatomovye vodorosli planktona Chernogo morya*. Moscow ; Leningrad : Izd-vo AN SSSR, 1955. 222 p. (in Russ.)]. <https://repository.marine-research.org/handle/299011/6623>
 16. Прошкина-Лавренко А. И. *Диатомовые водоросли бентоса Чёрного моря*. Москва ; Ленинград : Изд-во АН СССР, 1963. 243 с. [Proshkina-Lavrenko A. I. *Diatomovye vodorosli bentosa Chernogo morya*. Moscow ; Leningrad : Izd-vo AN SSSR, 1963, 243 p. (in Russ.)]
 17. Реунова Ю. А., Айздайчер Н. А. Влияние детергента на содержание хлорофилла *a* и динамику численности у микроводоросли *Chroomonas salina* (Wils.) Butch. (Cryptophyta). *Альгология*. 2004. Т. 14, № 1. С. 32–38. [Reunova Yu. A., Aizdaicher N. A. Vliyanie detergenta na sodержanie khlorofilla *a* i dinamiku chislennosti u mikrovodorosli *Chroomonas salina* (Wils.) Butch. (Cryptophyta). *Algologiya*, 2004, vol. 14, no. 1, pp. 32–38. (in Russ.)]
 18. Романова Д. Ю., Петров А. Н., Неврова Е. Л. Действие сульфата меди на рост и морфологию клеток клоновых культур четырёх видов бентосных диатомовых водорослей (Bacillariophyta) Чёрного моря // *Морской биологический журнал*. 2017. Т. 2, № 3. С. 53–67. [Romanova D. Yu., Petrov A. N., Nevrova E. L. Copper sulphate impact on growth and cell morphology of clonal strains of four benthic diatom species (Bacillariophyta) from the Black Sea. *Morskoy biologicheskij zhurnal*, 2017, vol. 2, no. 3, pp. 53–67. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.21072/mbj.2017.02.3.05>
 19. Спиркина Н. Е. *Исследование культуры зелёной микроводоросли *Monoraphidium arcuatum* как нового тест-объекта для оценки качества водной среды* : дис. ... канд. биол. наук. Москва, 2016. 172 с. [Spirkina N. E. *Issledovanie kul'tury zelenoi mikrovodorosli Monoraphidium arcuatum kak novogo test-ob'ekta dlya otsenki kachestva vodnoi sredy*. [dissertation]. Moscow, 2016, 172 p. (in Russ.)]
 20. Шлегель Г. *Общая микробиология* : пер. с нем. Москва : Мир, 1987. 567 с. [Schlegel H. G. *Allgemeine Mikrobiologie*. Moscow : Mir, 1987, 567 p. (in Russ.)]
 21. Andersen R. A., Berges J. A., Harrison P. J., Watanabe M. M. Recipes for freshwater and seawater media. In: *Algal culturing techniques / R. A. Andersen (Ed.)*. San Diego : Elsevier Academic Press, 2005, pp. 429–538.
 22. Davidovich N. A., Davidovich O. I., Podunay Yu. A., Gastineau R., Kaczmarzka I., Poulíčková A., Witkowski A. *Ardissonea crystallina* has a type of sexual reproduction that is unusual for centric diatoms. *Scientific Reports*, 2017, vol. 7, article 14670 (16 p.). <http://www.nature.com/articles/s41598-017-15301-z>
 23. Kim J. W., Price N. M. The influence of light on copper-limited growth of an oceanic diatom, *Thalassiosira oceanica* (Coscinodiscophyceae). *Journal of Phycology*, 2017, vol. 53, iss. 5, pp. 938–950. <https://doi.org/10.1111/jpy.12563>
 24. Markina Z. V., Aizdaicher N. A. Content of photosynthetic pigments, growth, and cell size of microalga *Phaeodactylum tricornerutum* in the copper-polluted environment. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2006, vol. 53, no. 3, pp. 305–309. <https://doi.org/10.1134/S1021443706030034>

25. Markina Zh. V., Aizdaicher N. A. Influence of the ariel detergent on the growth and physiological state of the unicellular algae *Dunaliella salina* (Chlorophyta) and *Plagioselmis protonga* (Cryptophyta). *Hydrobiological Journal*, 2010, vol. 46, iss. 2, pp. 49–56. <https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v46.i2.60>
26. Reid G. *A revision of the family Pleurosigmales* / A. Witkowski (Ed.). Ruggell : A. R. G. Gantner Verlag K. G., 2012, 163 p. (Diatom Monographs ; vol. 14).
27. Rijstenbil J. W., Gerringa L. J. A. Interactions of algal ligands, metal complexation and availability, and cell responses of the diatom *Ditylum brightwellii* with a gradual increase in copper. *Aquatic Toxicology*, 2002, vol. 56, iss. 2, pp. 115–131.
28. Round F. E., Crawford R. M., Mann D. G. *The Diatoms. Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge : Cambridge University press, 1990, 747 p.
29. Seckbach J., Kociolek J. P. (Eds). *The Diatom World*. Berlin ; Heidelberg ; New York : Springer Verlag, 2011, 533 p. (Book series : Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology ; vol. 19). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-1327-7>
30. *SigmaPlot 12.5 User's Guide*. USA : Systat Software Inc., 2013, 455 p.

ESTIMATION OF CELL DISTRIBUTION HETEROGENEITY AT TOXICOLOGICAL EXPERIMENTS WITH CLONAL CULTURES OF BENTHIC DIATOMS

A. N. Petrov and E. L. Nevrova

A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation
E-mail: alexpet-14@mail.ru

An increase in anthropogenic pressure on coastal water areas requires regular monitoring of marine ecosystems. The appropriate bioindicators for indirect assessment of the quality of the near-shore environment are benthic diatom algae, which are a key element of coastal communities and are highly sensitive to environmental impact. Changes in the development of diatoms under the influence of various toxicants may be used as relevant tool for monitoring of marine environment quality. However, scientific and methodological approaches to application of benthic diatom algae as test objects remain unstudied. One of the important methodological problems is the assessment of the significance of the samples in experimental vessels when counting cells abundance at different stages of toxicological test. The study is focused on assessment of the statistical significance of the equality of the initial mean number of cells of clonal culture inoculum placed into each of the replicates, as well as the statistical uniformity of cell distribution over the entire bottom area of Petri dishes. We used clonal cultures of three benthic diatom species belonging to different classes of Bacillariophyta: *Thalassiosira excentrica* Cleve, 1903 (Coscinodiscophyceae), *Ardissonea crystallina* (C. Agardh) Grunow, 1880 (Fragilariophyceae), and *Pleurosigma aestuarii* (Bréb. in Kütz.) W. Smith, 1853 (Bacillariophyceae). They significantly differ in valve morphology and life history (floating in water mass, attached to substrate, and motile). The results of statistical comparison of cell number variability in the experiment for all studied species confirmed the absence of significant differences between the mean values of the tested parameter at a standard significance level (0.05). It was shown that despite specific differences in cell growth rate during the experiment, the variability in cell number in the microscope viewing fields varies irregularly. The highest value of the variability coefficient was observed on the 5th day for the small-sized species *T. excentrica* ($Cv = 42...55\%$), and the lowest variability – for the large-cell species *A. crystallina* ($Cv = 27...31\%$). The absence of significant differences in cell number between three replicates (for each species) was established both during the initial placing of inoculum into the dishes and on the following days of the experiment. The conclusion is applicable for each of diatom species studied, which allows to consider all replicates as subsamples of the replicate sample and to average the results obtained at different stages of the toxicological experiment. The uniformity of cell distribution throughout experimental dishes bottom, which does not depend on species and absolute cell number, was statistically proven. The results obtained allow to statistically reliably estimate the changes in cell number at different stages of toxicological experiment according to replicate sampling, based on cell counting in a limited number of viewing fields.

Keywords: toxicological experiment, methodology, statistical estimation, Bacillariophyta, *Thalassiosira excentrica*, *Ardissonea crystallina*, *Pleurosigma aestuarii*, Black Sea

УДК 582.261.1:678.7

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ КОЛОНИАЛЬНЫХ ПОСЕЛЕНИЙ МОРСКИХ БЕНТОСНЫХ ДИАТОМЕЙ НА ПОВЕРХНОСТИ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМЕРА

© 2020 г. **Ф. В. Сапожников¹, А. И. Салимон², А. М. Корсунский^{2,3}, О. Ю. Калинина^{1,4},
Ф. С. Сенатов⁵, Е. С. Статник², Ю. Цветинович²**

¹Институт океанологии имени П. П. Ширшова РАН, Москва, Российская Федерация

²Сколковский институт науки и технологии, Москва, Российская Федерация

³Оксфордский университет, Оксфорд, Соединённое Королевство

⁴Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова,
Москва, Российская Федерация

⁵Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»,
Москва, Российская Федерация
E-mail: fil_aralsky@mail.ru

Поступила в редакцию 10.10.2019; после доработки 28.04.2020;
принята к публикации 26.06.2020; опубликована онлайн 30.06.2020.

Тема взаимодействий пластика и природных сообществ к настоящему времени актуальна как никогда прежде. Постепенное накопление изделий из искусственных полимеров и их фрагментов в природной среде достигло того уровня, при котором уже невозможно не считаться с влиянием этих материалов на живые организмы. В первую очередь воздействию подвергаются сообщества микроорганизмов, населяющих разные биотопы (как водные, так и наземные). Эти существа находятся на переднем крае взаимодействия с пластиком, в том числе в морских экосистемах. Тем не менее для понимания данных процессов необходимо принимать во внимание несколько аспектов таких взаимодействий: влияние разных видов пластика на сообщества микроорганизмов через выделение в среду продуктов их разложения, формы использования пластика самими микроорганизмами, в том числе механизмы колонизации его поверхности, а также возможные процессы биодеструкции полимеров за счёт деятельности микроорганизмов. При этом разные виды пластика могут отличаться не только механической прочностью, но и устойчивостью к биодеструкции, вызываемой микроорганизмами. Эксперименты с колонизацией поверхности видов пластика, разных по составу и механической прочности, позволяют получить широкий спектр результатов, актуальных не только для понимания современных природных процессов с участием пластика: эти результаты важны и для применения в некоторых областях развития технологий (например, при создании композитных материалов). В частности, представляют большой интерес исследования форм и механизмов устойчивой колонизации особо прочных полимеров видами диатомовых водорослей из состава природных сообществ. За счёт обрастания поверхности особо прочных синтетических полимеров диатомеями возможно формирование единого диатомово-полимерного композита, общие свойства которого уже существенно отличаются от свойств полимера как такового. Например, при обрастании полимера диатомеями, плотно удерживающимися на его поверхности за счёт физиологических механизмов, обеспечивающих им надёжную фиксацию, суммарная площадь поверхности композита возрастает на 2–3 порядка по сравнению с таковой голого полимера. Такие композиты и их свойства формируются за счёт механизмов колонизации субстратов, используемых диатомеями из естественных морских ценозов, — при переносе этих механизмов на новый, перспективный для заселения диатомеями материал. Возможности практического применения этих композитов лежат в сфере тепло- и звукоизоляции, а также

в области создания протезирующей ткани при операциях на костях. В наших экспериментах отслежены последовательности развития устойчивого композита при колонизации диатомеями поверхности образцов особо прочного синтетического полимера, стойкого к коррозии. Процесс заселения образцов происходил на базе сообществ, сформированных в накопительных культурах из природной морской среды. Образцы сверхвысокомолекулярного полиэтилена низкого давления (СВМПЭ) с гладкой и пористой структурой поверхности (с открытой ячейкой, до 80 объёмных % пористости) были подвергнуты колонизации диатомовыми водорослями *Karayevia amoena* (Hust.) Bukht., 2006, *Halamphora coffeaeformis* (C. Agardh) Levkov, 2009 и *Halamphora cymbifera* (W. Greg.) Levkov, 2009. Лабораторные эксперименты продолжались три недели. Накопительные культуры микрофитов, на базе которых проводили эксперименты, были получены из Балтийского моря (район г. Балтийска, Россия) и Аравийского моря (район г. Мумбаи, Индия). Типы и стадии развития колониальных поселений на различных элементах микрорельефа фронтальной поверхности и в подлежащих полостях изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа на образцах, подвергнутых поэтапной термической сушке. Отдельные клетки *K. amoena*, *H. coffeaeformis* и *H. cymbifera*, их цепочковидные агрегаты и распротёртые колониальные поселения занимают различные по степени неоднородности элементы поверхности микрорельефа, образуя структуры мощностью в 1–2 слоя со средней высотой поселения 1–1,3 высоты единичной особи. Клетки *K. amoena* плотно фиксируются на полимерном субстрате, используя поровый аппарат нижней створки панциря. При этом наблюдения с помощью сканирующего электронного микроскопа выявили отпечатки панцирей на субстрате, являющиеся признаками внедрения полимерной подложки в ареолы гипотеки. Рассмотрены механизмы распространения диатомей трёх указанных видов по различным элементам поверхности СВМПЭ, а также формирования характерных элементов колониальных поселений, в том числе для *K. amoena* — последовательно в форме «горшков» и сфер, посредством взаимодействия с поверхностью полимера и её растяжения по мере нарастания количества плотно прикреплённых клеток в колониальном поселении.

Ключевые слова: диатомеи, диатомовые водоросли, Bacillariophyta, колонизация пластика, СВМПЭ, устойчивые материалы, пластик в морской среде, аквакультура

Диатомеи многие десятилетия привлекают внимание широкого круга учёных из-за своей роли в экологии биосферы в целом — как производители примерно $\frac{1}{4}$ земного органического вещества и почти $\frac{1}{3}$ всего генерируемого на планете кислорода. Сравнительно недавно в сфере материаловедения началось изучение иерархической многоуровневой организации, наблюдаемой в устройстве панцирей диатомовых водорослей, и, как следствие, их биомеханических характеристик. Подробно рассмотрены многие аспекты взаимодействия клеток с различными субстратами [6 ; 7 ; 14 ; 15 ; 16 ; 17 ; 24], однако адекватного ответа на ряд вопросов до сих пор нет. Более глубокое понимание упомянутых аспектов ожидают получить благодаря использованию современных методов FIB-SEM (focused ion beam scanning electron microscopy, сканирующая электронная микроскопия с фокусированным ионным пучком) [6 ; 20 ; 25]. Применение технологий аквакультуры может расширить использование диатомей в качестве устойчивого ресурса для биотоплива, биоминерализации и производства материалов. Как важную экологическую проблему рассматривают сейчас и потенциальную биодеградацию загрязняющих гидросферу полимеров с помощью обрастания их диатомеями [2 ; 6 ; 22 ; 23 ; 26].

Сверхвысокомолекулярный полиэтилен низкого давления (далее — СВМПЭ), коммерциализированный компанией Celanese [9], представляет собой полимер с высокими механическими характеристиками, используемый в морской практике для изготовления канатов и парусов с 1990-х гг. В силу биоинертности, а также приемлемых механических свойств и износостойкости растёт сфера применения СВМПЭ в хирургии — при создании имплантов костей и суставов, а в последнее время и в процессах реконструкции на клеточном уровне, в качестве скаффолдов для тканевой инженерии [13]. Будучи колонизированными мезенхимальными стромальными клетками, скаффолды из СВМПЭ с открытой пористостью демонстрируют высокую способность к остеоинтеграции и васкуляризации [21].

Основная идея данного исследования состоит в следующем: если отдельные виды диатомей из природных морских сообществ способны колонизировать поверхность различных видов пластика [4 ; 5 ; 6], в том числе СВМПЭ, то в ряде случаев этот процесс можно квалифицировать

как способ создания нового класса биокоррозионно- и деформационно-устойчивых материалов — диатомово-полимерных гибридов. Теоретически можно рассмотреть ряд процессов, сопровождающих колонизацию синтетического полимера:

- А. «Поверхностная однослойная колонизация» пройдёт без существенной пролиферации диатомей в глубину субстрата за счёт отсутствия его пористости. В случае если колонизированная поверхность будет разрушаться в результате биодеградации, с течением времени этот процесс завершится дезинтеграцией полимерных изделий на фрагменты различного размера, что может быть использовано как технология борьбы с загрязнением среды макроскопическим пластиком.
- Б. В противоположность «поверхностной однослойной колонизации», на поверхности биостойких полимеров возможно развитие довольно толстого, плотного и механически прочного многослойного покрытия с барьерными или другими свойствами, ценными для практического применения.
- В. «Колонизация объёма» из-за интенсивной пролиферации в глубину пористого (ячеистого) полимера создаст, как ожидается, устойчивый объёмный диатомово-полимерный композит с широким спектром технических характеристик, имеющих большое значение для решения конструкционных, трибологических, фильтрационных и тепловых задач, а также для использования в сфере вибро- и звукоизоляции. Расширение спектра возможных применений обусловлено существенным ростом суммарной поверхности композита — на 2–3 порядка по сравнению с неколонизированной поверхностью полимера.

Поскольку СВМПЭ обладает значительной химической и биологической устойчивостью, он является важным кандидатным материалом для изучения процесса колонизации его поверхности и объёма. В этом исследовании мы обсудим первые результаты по структурным аспектам взаимодействия морских диатомовых водорослей из природных сообществ микрофитобентоса с поверхностью пористого СВМПЭ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для изучения процесса колонизации поверхности использовали образцы СВМПЭ двух типов — гладкие и пористые. Образцы обоих типов экспонировали в накопительных культурах диатомей, выделенных с песчаной литорали: I — в р-не г. Мумбаи (Аравийское море); II — в р-не г. Балтийска (Калининградский залив, Балтийское море). В обеих накопительных культурах диатомей росли при естественном рассеянном свете, в условиях чередования дня и ночи (на подоконнике в лаборатории Института океанологии РАН), в диапазоне температур +5...+30 °С (от наиболее холодных зимних месяцев к наиболее тёплым летним), покрывая стенки 1-литровых лабораторных сосудов из полиэтилентерефталата (далее — ПЭТФ) и полиэтилена низкого давления (далее — ПНД). Рост культур происходил без дополнительной аэрации, в том же объёме воды, в котором они были доставлены из природных биотопов. Солёность морской воды в первом сосуде составляла 30 ‰, во втором — 5 ‰. Возраст культуры I к моменту начала экспериментов по колонизации составил 21 месяц, культуры II — 20 месяцев. В культуре I доминировали представители рода *Halamphora* (Cleve) Levkov — *Halamphora coffeaeformis* (C. Agardh) Levkov, 2009 (рис. 1с–е) и *Halamphora cymbifera* (W. Greg.) Levkov, 2009 (рис. 1f); в культуре II — *Karayevia amoena* (Hust.) Bukht., 2006 (рис. 1a, b).

Выбор условий культивирования — достаточно жёстких для морских бентических диатомей, взятых из природной среды, — был продиктован необходимостью получения смешанных накопительных культур из нескольких видов, максимально приспособленных к совместному развитию на протяжении длительного времени при отсутствии дополнительной аэрации и подкормки биогенами извне и при существенных изменениях условий освещения и температуры среды. Факт колонизации поверхности стенок сосудов разными видами диатомей заслужил особого внимания и стал основой для экспериментов с колонизацией СВМПЭ.

Образцы гладкого СВМПЭ получены путём термической нарезки плотного (не пористого) цилиндра диаметром 26 мм на «таблетки» высотой 2–3 мм с выглаженными за счёт оплавления поверхностями.

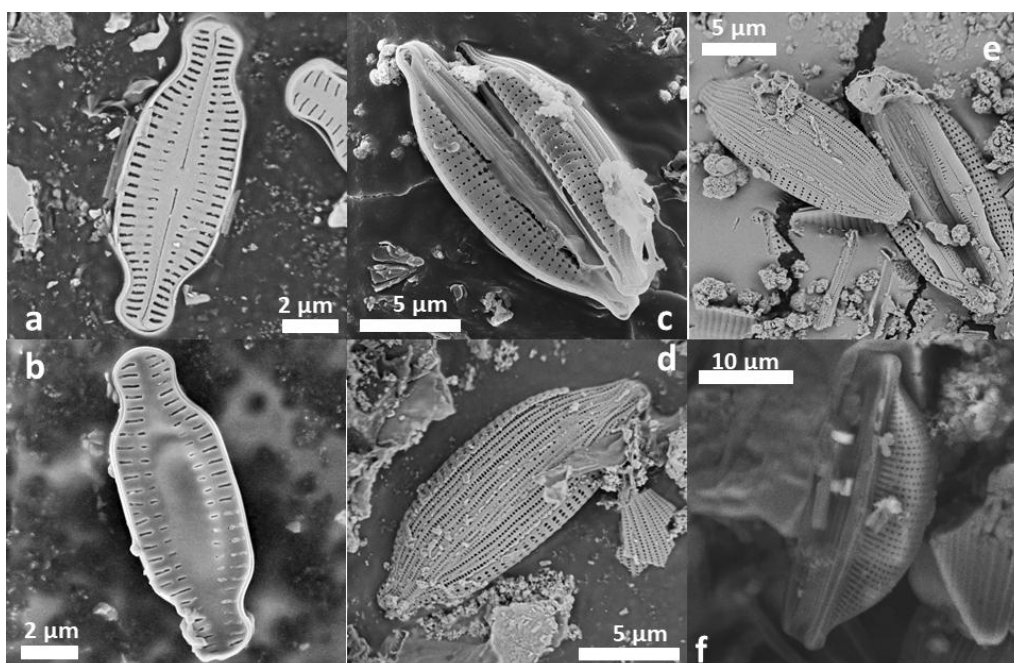


Рис. 1. Наиболее массовые виды диатомей, сформировавших обрастания на поверхности образцов пористого СВМПЭ: а, b — *Karayevia amoena* (в накопительной культуре II); с–е — *Halamphora coiffeaeformis*; f — *Halamphora cymbifera* (в накопительной культуре I)

Fig. 1. The most common diatom species that formed fouling on the surface of porous UHMWPE samples: a, b – *Karayevia amoena* (in storage culture II); c–e – *Halamphora coiffeaeformis*; f – *Halamphora cymbifera* (in storage culture I)

Образцы пористого СВМПЭ изготовлены в соответствии с методом, представленным в [12]. Смешивали порошок СВМПЭ (4120 GUR Ticona®) и пищевую каменную соль (NaCl) с размером частиц порошка 80–700 мкм. Сухую смесь с весовым соотношением компонентов 1 : 9 осторожно перемешивали с использованием планетарной шаровой мельницы Fritsch Pulverisette 5 (Fritsch GmbH, Германия) в агатовых барабанах (объём — 500 мл), заполненных шариками корунда с диаметром 8 мм. Термическую прессовку осуществляли под нагрузкой 70 МПа при +180 °С. Далее удаление соли проводили с использованием дистиллированной воды при +60 °С с помощью ультразвуковой мойки. Данный процесс привёл к образованию пористых структур с открытыми порами, с объёмной пористостью около 80 %.

Для получения экспериментального оброста поверхности гладкого и пористого СВМПЭ (с разным микрорельефом поверхности) различные его образцы — по три повторности для каждого — были экспонированы в накопительных культурах на период 21 сутки при постоянном рассеянном освещении светодиодной лампой LED1106 G2 2.3 W, 18 mA, 35 lm/W. Размеры прямоугольных образцов пористого СВМПЭ составляли 40×19×3 мм, диаметр гладких образцов — 25 мм. По два лабораторных сосуда из бесцветного ПЭТФ и ПНД ёмкостью 1 л с накопительными культурами располагались на расстоянии 45 см от источника света. Интенсивность освещения составляла 135 лк.

Трёхнедельная продолжительность эксперимента объясняется тем, что к концу этого периода на поверхности образцов пористого СВМПЭ сформировались обширные россыпи бурых пятен обрастания, хорошо различимые невооружённым глазом. Это позволило перейти к стадии микроскопирования материала.

В сосудах 1 и 2 на стенках (ПЭТФ) росли колониальные поселения диатомей из накопительной культуры II; в сосудах 3 и 4 на стенках (ПНД) — колониальные поселения диатомей из накопительной культуры I. В сосуде 1 экспонированы: пористый СВМПЭ, образцы № 8 и 9 — по три повторности, в два ряда, по три в ряд. В сосуде 2 экспонированы: пористый СВМПЭ, образец № 10 — три повторности, верхним рядом, и «таблетки» гладкого СВМПЭ — три повторности, нижним рядом.

В сосуде 3 экспонированы, по аналогии с сосудом 1, образцы пористого СВМПЭ № 1 и 2. В сосуде 4 экспонированы, по аналогии с сосудом 2: образец пористого СВМПЭ № 3 в трёх повторностях и три «таблетки» гладкого СВМПЭ. Общая схема эксперимента приведена на рис. 2.

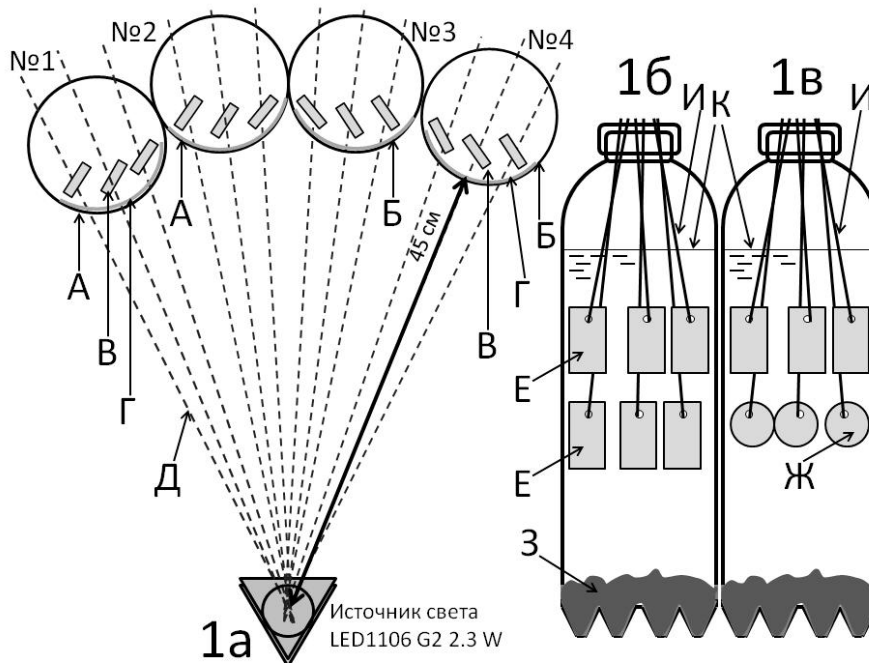


Рис. 2. Общая схема эксперимента с обрастанием поверхности образцов пористого и гладкого СВМПЭ морскими видами диатомей из состава различных накопительных поликультур. **1а** — схема эксперимента, вид сверху: А — мини-аквариумы (1-литровые бутылки) из ПЭТФ; Б — мини-аквариумы (1-литровые бутылки) из ПНД; В — образцы, расположенные под углом к источнику освещения; Г — слой колониальных поселений диатомей на стенке бутылки; Д — вектор направления светового потока от источника. **1б** — схема расположения образцов в бутылках № 1 и 3: Е — образцы пористого СВМПЭ; З — грунт со дна моря; И — медная проволока, фиксирующая образец СВМПЭ в воде, у стенки бутылки; К — уровень морской воды. **1в** — схема расположения образцов в бутылках № 2 и 4: Ж — образцы гладкого СВМПЭ

Fig. 2. General scheme of the experiment with colonization of the surface of porous and smooth UHMWPE samples by marine diatoms from various storage polycultures. **1а** — scheme of the experiment, top view: А — PET-mini-aquariums (1-L bottles); Б — HDPE-mini-aquariums (1-L bottles); В — samples located at an angle to light source; Г — layer of diatom colonial settlements on the bottle wall; Д — vector of the direction of the light flux from the source. **1б** — layout of samples in bottles No. 1 and 3: Е — porous UHMWPE samples; З — sea soil; И — copper wire fixing UHMWPE sample in water, near the bottle wall; К — seawater level. **1в** — layout of samples in bottles No. 2 and 4: Ж — smooth UHMWPE samples

В ходе эксперимента образцы СВМПЭ были подвешены в толще воды, на продетных петлях из медной проволоки (Glorex, 20 м × 0,4 мм, с антикоррозионным покрытием) на расстоянии 5–10 мм от стенок аквариумов, покрытых диатомовыми обрастаниями, под углом 30–40° к источнику света. Оброст видов рода *Halamphora* получен на образцах № 1, 2 и 3 (по три повторности для каждого), вида *Karayevia amoena* — на образцах № 8, 9 и 10 (также в трёх повторностях). В ходе экспериментов не производили контрольных извлечений образцов на протяжении 21 суток экспозиции, поэтому не представляется возможным определить время и место появления первых клеток диатомей на конкретных образцах.

При подготовке образцов для микрофотосъёмки с помощью сканирующего электронного микроскопа применяли новую авторскую методику трёхстадийной сушки: экспозиция в сушильном шкафу при +50 °С — 8 ч; при +80 °С — 3 ч; при +100 °С — 1 ч. Предложенная методика, нигде не опубликованная прежде, была основана:

1) на результатах экспериментов Ф. В. Сапожникова по сушке диатомового перифитона на нитчатых водорослях в сушильном шкафу, проведённых в 1996 г. на Беломорской биологической станции МГУ, целью которых было создание постоянных препаратов из высушенных панцирей диатомей на поверхности нитчаток без потери пространственной организации перифитона;

2) на данных об изменении свойств СВМПЭ при нагреве, позволяющих оценить степень плотности ассоциации панцирей с поверхностью образца.

Температура +80 °С — тот предел, за которым СВМПЭ начинает размягчаться, приобретая свойства густой смолы. Однако мелкие диатомеи, такие как *K. amoena* (длиной до 15 мкм), при этом не могут погружаться в толщу данного полимера за счёт собственного веса, поскольку их масса слишком мала, удельная поверхность широких оваловидов вращения, каковыми геометрически являются их панцири, довольно велика, а мягкость самого субстрата для этого недостаточна. Доказательством служит и тот факт, что более крупноклеточные виды диатомовых, использованные в экспериментах (*Halamphora coffeaeformis* и *H. cymbifera*, имеющие длину менее 30 и 50 мкм соответственно и геометрическую форму широкого оваловида вращения) не погружались в толщу полимера при нагреве свыше +80 °С. Добавим, что при +90 °С на образцах СВМПЭ начинает сказываться эффект памяти формы (расхожее материаловедческое обозначение этого процесса — «цилиндр сужается и вытягивается»), за счёт чего мелкие предметы, погружившиеся в него под собственной тяжестью, выталкиваются наружу. Таким образом, после финального этапа сушки на протяжении одного часа при +100 °С не следовало ожидать эффекта спонтанного впавления панцирей диатомей в поверхность этого полимера. Скорее, при неплотной ассоциации с полимером они бы отделились от поверхности за счёт выталкивающего эффекта памяти формы.

Образцы, экспонировавшиеся в накопительной культуре I, после первичной сушки были сильно покрыты солью, поэтому их дополнительно отмывали посредством двухсуточной экспозиции в дистилляте, а затем снова сушили 4 ч при +60 °С.

Микрофотосъёмку диатомового оброста проводили при увеличении от $\times 500$ до $\times 700$ с помощью трёх сканирующих электронных микроскопов: Hitachi TM 1000, Tescan LYRA и Tescan MAIA3.

Подсчёт панцирей на поверхности образцов СВМПЭ проводили вручную по микрофотографиям, помечая учтённые экземпляры в составе как цепочек, так и «плащевидных» поселений. При выделении дискретных пятен использовали маркеры разных цветов. Количество интервалов при выделении размерных классов пятен примерно подсчитывали по формуле:

$$h = 2(IQ)n^{-1/3},$$

где h — длина интервала;

(IQ) — разница между верхним и нижним квартилем (по формуле Фридмана — Диакониса [8]).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Колонизации поверхности образцов гладкого СВМПЭ не произошло ни в одной из накопительных культур диатомовых водорослей. Полученный результат важен в силу его потенциального применения при конструировании морских необрастающих подводных конструкций из СВМПЭ с гладкой поверхностью.

Эксперименты с колонизацией поверхности образцов пористого СВМПЭ показали ряд важных особенностей этого процесса, в том числе общих, у различных видов диатомей. Так, в накопительных культурах, где на песчаном субстрате развивались многие виды диатомей, а на стенках экспериментальных сосудов поселялись только несколько видов с преобладанием названных выше, перешли на образцы СВМПЭ лишь отдельные таксоны.

Так, накопительная культура II насчитывала 10 видов бентических диатомей. Из них *Karayevia amoena* образовывал многочисленные и плотные колониальные поселения на стенках сосудов из ПЭТФ и разреженные поселения — на песчинках на дне ёмкости, *Melosira nummuloides*

C. Agardh — немногочисленные короткие цепочки, а остальные виды из родов *Amphora* Ehr. ex Kütz., *Diploneis* (Ehr.) Cleve, *Nitzschia* Hassall и *Fallacia* Stickle et D. G. Mann часто встречались на песке и изредка — на стенках сосуда. Из накопительной культуры II перешли к обитанию на новом субстрате (пористом полиэтилене) только два первых упомянутых вида — *K. amoena* и *M. nummuloides*.

Исследования с помощью сканирующего электронного микроскопа не выявили развития на образцах СВМПЭ бактериальных колоний. В свою очередь, *K. amoena* сформировала на поверхности различных образцов СВМПЭ колониальные поселения разных типов.

В составе накопительной культуры I отмечены три вида из рода *Halamphora*, два — *Karayevia* Round et Bukhtiyarova ex Round, два — *Nitzschia*, один — *Navicula* Bory. Все бентические диатомеи жили не только в песке на дне сосуда, но и на стенках, образуя на них плотные пятна колониальных поселений, в составе которых доминировала *H. coffeaeformis*. На образцах пористого СВМПЭ поселились только *H. symbifera*, *H. coffeaeformis* и *K. amoena*. Третий вид в культуре I имел морфологические отличия от такового в культуре II и встречался редко, отдельными клетками, в то время как первые два вида образовали колониальные поселения различных типов. Доминирующим видом, формировавшим наиболее обширные колониальные поселения на пористом СВМПЭ, здесь также являлась *H. coffeaeformis*. На поверхности образцов СВМПЭ и в данном эксперименте не было зафиксировано бактериальных колоний, но встречались отдельные клетки палочковидных бактерий.

Все три вида, показавшие активный рост на пористом СВМПЭ (*K. amoena*, *H. coffeaeformis* и *H. symbifera*), являются бентическими и ведут в природе прикрепленный образ жизни, колонизируя различные субстраты (поверхность минеральных песчинок и растительных остатков, хитиновые панцири отмерших беспозвоночных). При этом по макро- и микроморфологии панциря, способности к активному движению и способу закрепления на субстрате представители рода *Karayevia* существенно отличаются от таковых *Halamphora* [3 ; 10 ; 11 ; 19]. Крайне малоподвижная *K. amoena* прикрепляется к поверхности субстрата весьма плотно, и все перемещения её клеток сводятся к тому, что верхняя дочерняя клетка после деления отползает от нижней на расстояние, не превышающее, как правило, её длины. До настоящего времени не сообщалось о самостоятельном перемещении *K. amoena* на расстояния значительно больше длины её панциря. Перенос клеток этого вида на новые места обитания, существенно удалённые от прежних, происходит исключительно за счёт действия внешних факторов при движении воды или при перемещении частиц уже заселённого ими субстрата. В частности, мы рассматриваем возможность переноса клеток на поверхность СВМПЭ (из состава колониальных поселений на стенках сосудов и с поверхности песчаного грунта) с помощью пузырьков выделявшегося микрофитами кислорода, так как стенки этих пузырьков, отделившихся от оброста, часто имели буроватый цвет. Напротив, клетки *H. coffeaeformis* и *H. symbifera* ведут прикрепленный образ жизни и малоподвижны, однако всё же способны перемещаться на расстояния, во много раз превышающие длину их панциря, что может отражаться на характере формируемых ими поселений [18].

Мы наблюдали три основных вида колониальных поселений, между которыми существовали переходные формы. Это позволяет предположить, что заселение пористого СВМПЭ *K. amoena* происходит в три последовательных стадии. Сначала клетки данной диатомеи распространяются по субстрату, формируя цепочки первичной колонизации (рис. 3). Для этого они используют верхушки (гребни) или же краевые области складок и хлопьевидных фрагментов поверхности. Цепочки этого типа характеризуются терминальным (верхушечным) ростом: они образуются вследствие деления клеток и дальнейшего перемещения каждой верхней дочерней клетки от нижней на небольшое расстояние по поверхности наиболее высоко выступающих элементов микрорельефа образца. Интеркалярное удвоение клеток в такой цепочке происходит локально и только в местах «ветвления» микрорельефа: к основному направлению роста добавляются боковые отростки, также удлиняющиеся терминально. Можно предположить, что формирование данных цепочек — это не только первичная колонизация поверхности, но и процесс поиска участков, на которых возможно образование более компактных колониальных поселений.

При достижении такими цепочками участков рельефа, характеризующихся либо высокой плотностью расположения складок (в особенности на холмовидных поднятиях), либо, наоборот, относительной гладкостью поверхности (включая дно небольших лакун), начинается образование цепочек вторичной колонизации. Эти структуры формируются за счёт удвоения уже не только терминальной клетки в цепочке, но и всех остальных её клеток, достигших такого участка. В результате образуются продолговатые извилистые или ветвящиеся структуры из клеток, расположенных в два ряда «по принципу ёлочка» (паркет «ёлочка») (рис. 4). Если цепочка первичной колонизации имела существенные (длиной хотя бы в 1–1,5 клетки) интервалы (разрывы), то из неё могут образоваться несколько цепочек вторичной колонизации. При квазиоднородном характере микро рельефа цепочки первичной, а затем и вторичной колонизации способны покрыть поверхность субстрата довольно густой сетью (рис. 4).

Цепочки вторичной колонизации дают начало «ядрам», или наиболее плотным, инициальным группам клеток, при разрастании колониальных поселений. Продолжая часто удваиваться в составе цепочек вторичной колонизации, клетки *K. amoena* эффективно распространяются по участку с высокой плотностью складок (часто по «холму») или же по ограниченному участку относительно ровной поверхности, заполняя всю доступную его площадь. Так формируется третья стадия колонизации, или «плащевидное» поселение (рис. 5).

Область, покрываемая таким поселением, зависит от масштаба пространства элементов микро рельефа, обеспечивающего его развитие. Отметим, что эти обширные поселения, образованные зачастую из сотен и тысяч клеток, состоят из более мелких фрагментов мозаики, или «пятен» сходной конфигурации [1]. «Пятна» бывают хорошо различимы по узким извилистым зазорам между ними, а также по направлению осей клеток, из которых состоят. Эти «пятна», как правило, выглядят бугорками в составе поселения, располагаются по отношению друг к другу под разными углами и соответствуют очагам интенсивного деления клеток. При развитии особенно густого «плащевидного» поселения они отображают особенности поверхности микро рельефа, на которой происходит их формирование. На образцах СВМПЭ различной пористости такие

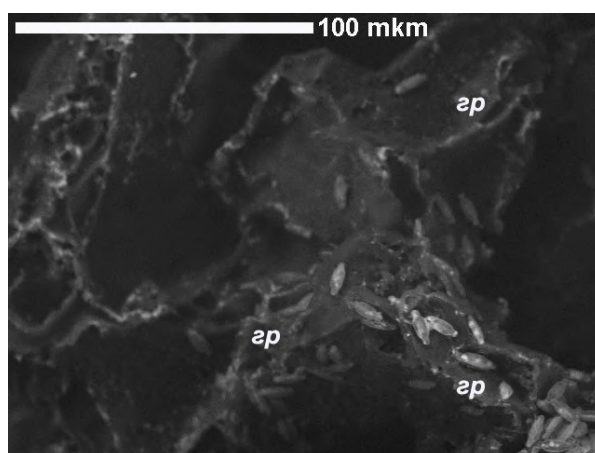


Рис. 3. Цепочки первичной колонизации пористого СВМПЭ клетками *Karayevia amoena*. На переднем плане цепочки проходят по гребням складок субстрата (gp)

Fig. 3. Primary colonization chains of porous UHMWPE by *Karayevia amoena* cells. In the foreground, the chains pass along the crests of substrate folds (gp)

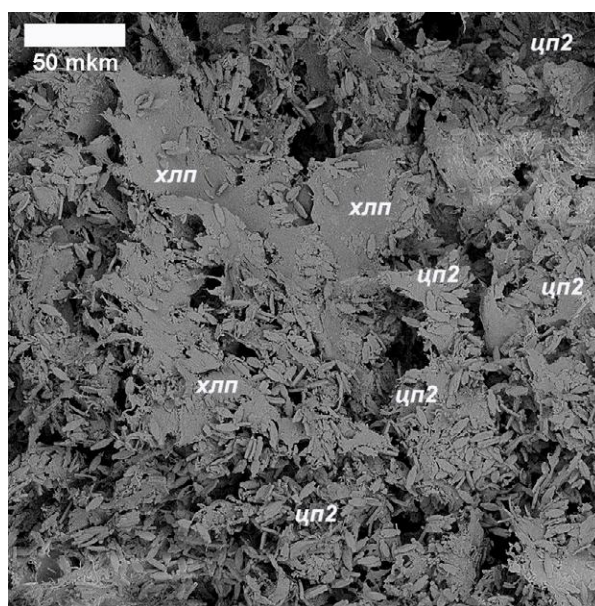


Рис. 4. Цепочки вторичной колонизации (цп2) пористого СВМПЭ диатомеей *K. amoena*. Структуры из клеток, расположенных в два ряда «по принципу ёлочка» (паркет «ёлочка»). Субстрат представлен мелкими хлопьевидными фрагментами (хлп) относительно ровной поверхности

Fig. 4. Secondary colonization chains (цп2) of porous UHMWPE by diatom *K. amoena*. Cell structures arranged in two rows according to “herringbone principle” (“herringbone” parquet). The substrate is represented by small flocculent fragments (хлп) of a relatively flat surface

«пятна» различаются обилием клеток. При достижении предельной плотности упаковки, когда клетки поселения уже покрывают субстрат в 1–1,3 плотных слоя и начинают приподниматься над ним в виде бугра, они перестают массово делиться, как отмечено в составе обширных распротёртых «плащевидных» поселений. Зафиксировано также, что периодически, в условиях малой площади доступной относительно ровной поверхности, клетки продолжают удвоение и начинают активно преобразовывать субстрат, как это будет описано ниже.

На участках поверхности образца № 8, которая представлена в основном относительно гладкими хлопьями шириной 20(30)–80 мкм, изорванными по краям, размер цепочек первичной колонизации колебался от 2 до 12 клеток (в среднем — по 3), с преобладанием цепочек по 3–4 клетки. Размер цепочек вторичной колонизации на стадии обильного формирования «ёлочек» и покрытия субстрата густой сетью варьировал здесь от 3 до 23 клеток (в среднем — 9,94), с преобладанием цепочек по 6–11 клеток (на их долю приходилось суммарно 48,75 %) (рис. 6). В свою очередь, размер «пятен» колебался от 9 до 73 клеток (в среднем — 31,01); наиболее крупные из них имели ветвистые очертания.

Между тем в структуре «плащевидных» поселений преобладали (суммарно 65 %) «пятна» размером 19–35 клеток (рис. 6). Всего было учтено расположение 12 404 панцирей в составе 400 «пятен».

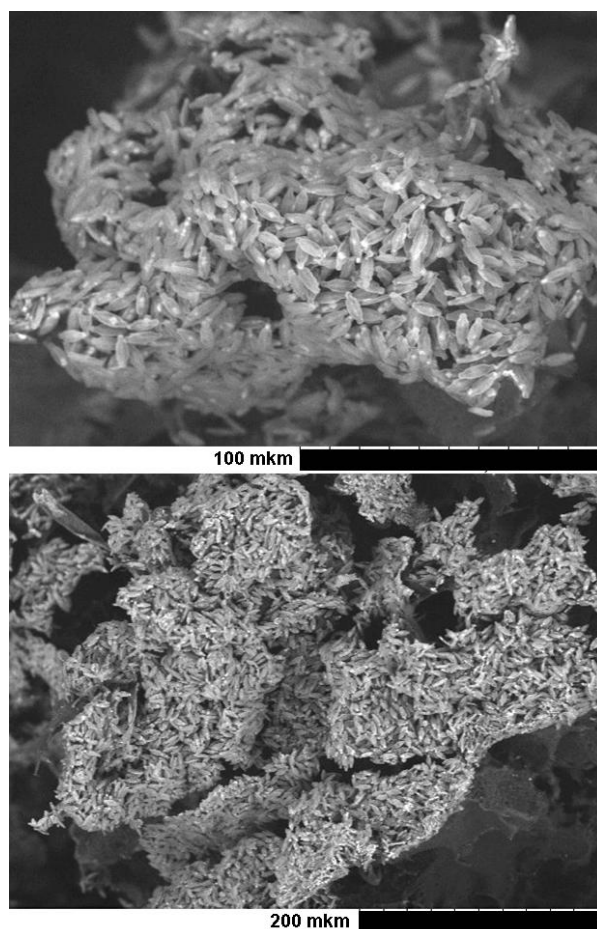


Рис. 5. Внешний вид участков «плащевидных» поселений *K. amoena* на поверхности пористого СВМПЭ (при разном увеличении)

Fig. 5. View of “cloak-like” areas of *K. amoena* settlements on the surface of porous UHMWPE (at different magnification)

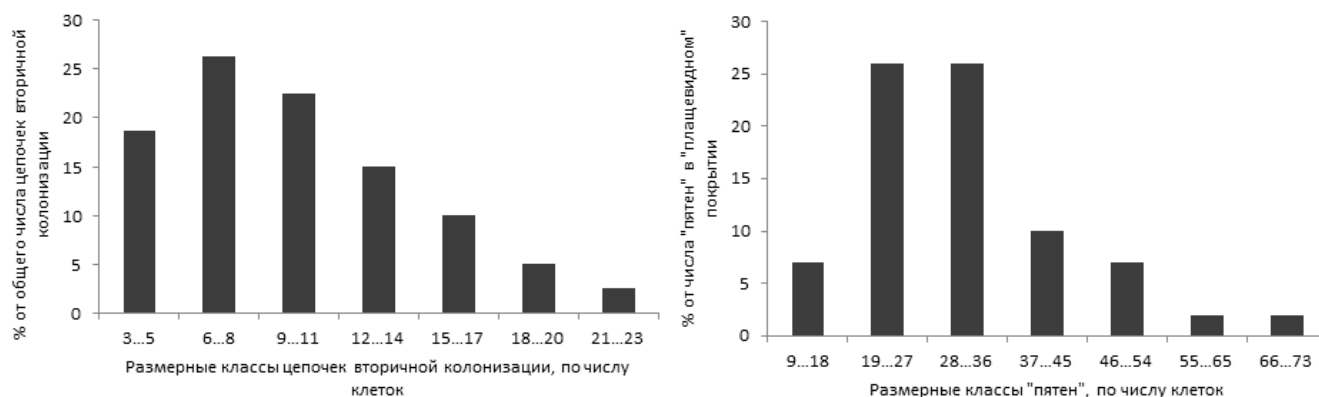


Рис. 6. Распределение частот размерных классов «пятен» в составе «плащевидных» колониальных поселений на поверхности образца № 8

Fig. 6. Frequency distribution of size classes of “spots” in “cloak-like” colonial settlements on the surface of sample No. 8

На поверхности образца № 10 складчатость была существенно выше. Так, микрорельеф был извилистым и мелкоскладчатым, состоял из трёхмерно ветвящихся структур, покрытых мозаикой мелких плоских участков (40–60 мкм по наибольшей оси), расположенных в разных плоскостях и разделённых тонкими невысокими складочками-барьерами. Цепочки первичной колонизации имели здесь длину 2–8 клеток (в среднем — 3–4 клетки); цепочки вторичной колонизации состояли из 3–15 клеток (в среднем — 5–8 клеток; 60 % приходилось на цепочки такой размерности) (рис. 7). «Пятна» состояли из 5–26 клеток (в среднем — 17), но преобладали среди них структуры двух типов — сформированные из 14–16 и из 19–21 клетки, в зависимости от особенностей микрорельефа поверхности (рис. 7). На данном образце было учтено 9 520 панцирей в составе 560 «пятен».

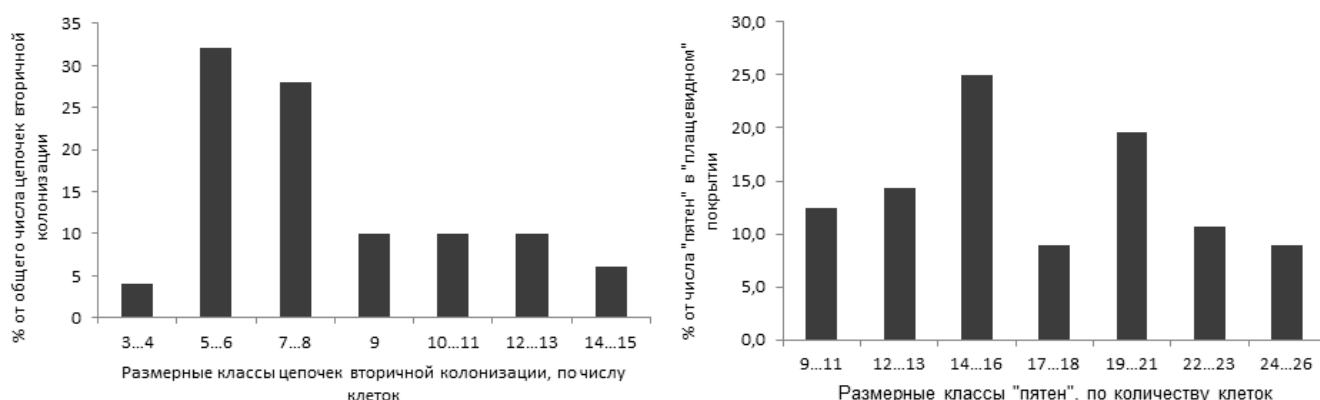


Рис. 7. Распределение частот размерных классов «пятен» в составе «плащевидных» колониальных поселений на поверхности образца № 10

Fig. 7. Frequency distribution of size classes of “spots” in “cloak-like” colonial settlements on the surface of sample No. 10

Важно отметить установленную нами способность *K. atoeana* к модификации микрорельефа СВМПЭ: с одной стороны — за счёт очень плотного прикрепления клеток к поверхности образца, с другой — за счёт их синхронного деления в рядах. При рассмотрении фрагментов развитого оброста на увеличении $\times 3000$ зафиксированы следующие типы деформации поверхности полиэтилена клетками диатомей.

Первый тип представлял собой гребни протяжённостью 20–30 мкм, выдавленные панцирями диатомей вследствие уплотнения оброста с обеих сторон от складки. Последовательное удвоение рядов клеток, плотно прикреплённых к субстрату, по обе стороны от невысокой, но широкой складки со встраиванием между ними новообразующихся рядов приводило к растягиванию самого субстрата: складка вытягивалась в узкий гребень. На таких гребнях росло по несколько клеток, находившихся в субстрате в лунках, которые отображали очертания панциря (рис. 8). Лунки могли сформироваться за счёт обжатия этих клеток, продолжающих плотно удерживаться на своих местах, при поднятии краёв верхушки гребня за счёт его растяжения в высоту, сопровождающегося выжиманием бровки в валик.

Второй тип образовывали отжатые и истончившиеся краевые области плоских участков поверхности, по краям которых находились диатомей в лунках по форме панциря (рис. 8).

Оба типа элементов крупной (по отношению к панцирям) деформации образовывались вследствие разрастания цепочек клеток в ширину (удвоения), а также из-за того, что панцири были плотно прикреплены к поверхности, а новообразованные ряды клеток встраивались между уже прикреплёнными рядами, при этом растягивая субстрат.

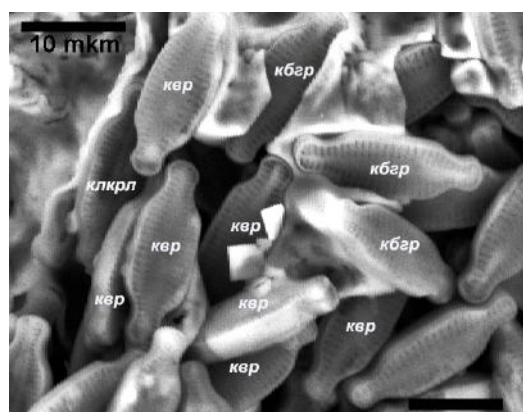


Рис. 8. Деформации поверхности СВМПЭ клетками *K. amoena* при формировании «плащевидного» поселения. Клетки на бровке гребня (*кбгр*), выдавленного из широкой складки субстрата плотными рядами клеток (*квр*), сидят в лунках, образовавшихся при выдавливании бровки в виде валика. Слева видна клетка в лунке (*кквл*) на отжатом участке краевой области (выжатый валик обрамляет клетку слева)

Fig. 8. UHMWPE surface deformations by *K. amoena* cells during the formation of a “cloak-like” settlement. Cells on the edge of the crest (*кбгр*), squeezed from a wide fold of the substrate in dense cell rows (*квр*), sit in the wells formed by extruding the brow in the form of a fold. The cell in the well (*кквл*) is visible on the left in the wrung-out part of the marginal area (the squeezed fold frames the cell on the left)

Совершенно особые вторичные структуры, формируемые *K. amoena* из СВМПЭ, отмечены на поверхности образца № 8 (рис. 9). При достижении максимальной плотности заселения ровного участка, относительно небольшого по площади, клетки начинали трансформацию его поверхности, используя плотное прикрепление к субстрату и увеличение числа соседствующих рядов и растягивая тем самым полимерный субстрат.

Сначала формировался кольцевой ряд, расположенный по краю участка (рис. 9а), и начиналось его удвоение в обе стороны с постепенным выдавливанием поверхности субстрата в невысокий кольцевой валик. Затем, отчлняя в процессе делений всё новые ряды в обе стороны — внутрь и наружу от кольцевого ряда, диатомеи выжимали валик уже в кольцевую стенку (рис. 9б). Ряды внутри такого строящегося «колодца» получали заведомо меньше света и биогенов, чем ряды снаружи, поскольку формировалось полузамкнутое пространство. В результате количество рядов снаружи росло быстрее, в том числе за счёт их интеркалярного удвоения вверх и вниз по всей высоте «колодца». Стенки «колодца» от этого выгибались наружу, формируя «горшок» (рис. 9с).

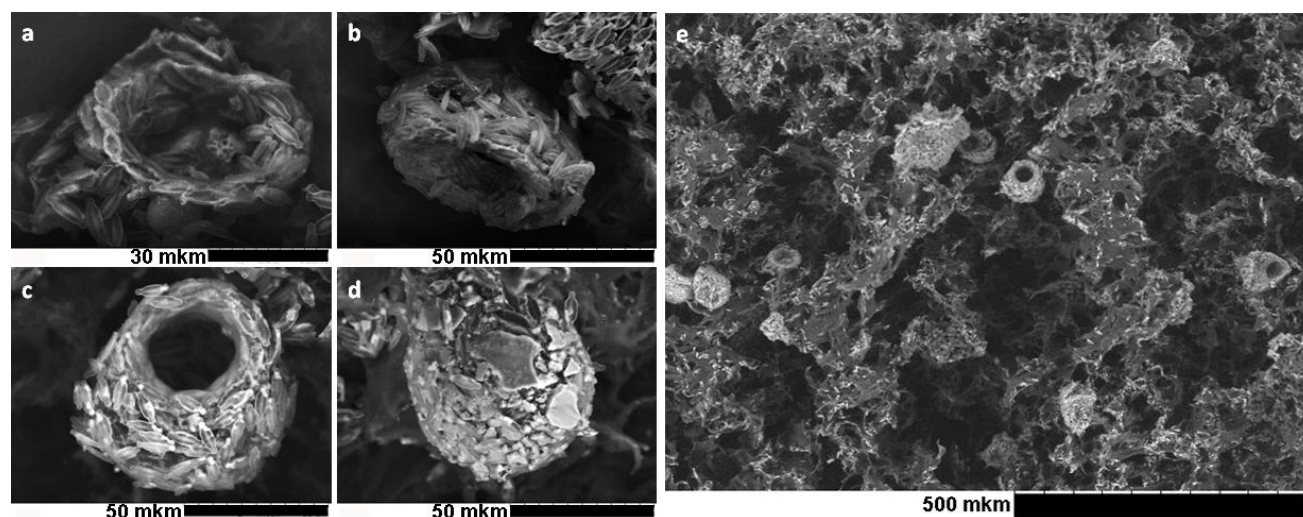


Рис. 9. Глубокая деформация поверхности пористого СВМПЭ растущим колониальным поселением *K. amoena*: а — образование кольцевого валика; б — стадия выдавливания валика в кольцевую стенку; с — стадия «горшка»; д — формирование фрагмента «плащевидного» поселения в форме шара, внутри оброста — выдавленный плотными рядами клеток в форме «горшка» фрагмент поверхности СВМПЭ; е — расположение выступающих фрагментов «плащевидного» поселения в форме «горшков» и шаров на фронтальной поверхности пористого СВМПЭ

Fig. 9. Deep deformation of the surface of porous UHMWPE by the growing *K. amoena* colonial settlement: а – formation of an annular fold; б – stage of fold extrusion in the annular wall; с – stage of the “pot”; д – formation of a fragment of a “cloak-like” settlement in the form of a sphere, inside the fouling there is a fragment of UHMWPE surface extruded by dense cell rows in the form of a “pot”; е – location of the protruding fragments of the “cloak-like” settlement in the form of “pots” and balls on frontal surface of porous UHMWPE

На поздних стадиях формирования такой структуры свет и биогены практически переставали поступать в её внутреннее пространство через узкое горло. В этот период рост числа клеток продолжался только снаружи, — и диатомеи в рядах формировали уже короткие последовательности из 3–4 клеток, образуя «финальные пятна» оболочки. Такие «финальные пятна» располагались под разными углами друг к другу. В конечной стадии формировалось подобие шара (рис. 9d): терминальное отверстие раздувшегося «горшка» закрывало «пятно» из диатомей наружной оболочки. Диаметр этих выдавленных структур составлял ≈ 60 мкм на стадии валика и ≈ 80 мкм на стадии «горшка»; объём в сформированном виде — ≈ 270 – 290 мкм³. Расстояние между «горшками» на фронтальной поверхности образца достигало при редком их расположении 300(400)–600(700) мкм, а при частом расположении, включая парное, — 10(40)–700 мкм (рис. 9е).

Колонизация поверхности пористого СВМПЭ в толщу образца происходила на глубину до 150–200 мкм — как в виде цепочек первичной колонизации по дну каверн, так и за счёт широких «плащевидных» поселений на участках глубокой складчатости фронтальной поверхности.

Последовательное формирование тех же трёх стадий колонизации пористого СВМПЭ отмечено и для *H. coffeaeformis*, но со своими особенностями. Во-первых, цепочки первичной колонизации у этого вида были существенно более разреженными (за счёт перемещения дочерних клеток на большие расстояния после деления). Во-вторых, в их составе чаще наблюдали интеркалярное деление клеток, и это не всегда сопровождалось отращиванием боковых «ветвей» по подходящим участкам микрорельефа. В-третьих, первичная колонизация происходила не только по выступающим, многоскладчатым участкам (на образцах № 1 и 2), но и по вогнутым элементам рельефа — как на поверхности образца № 3 (рис. 10). Здесь широкие, лишённые дополнительной складчатости и плавно изгибающиеся «лопасти» (шириной 200–400 мкм) часто перемежались с широкими кавернами (200–700 мкм по наибольшей оси), глубина которых составляла 200–500 мкм. В свою очередь, сами лопасти, благодаря своим изгибам, могли достигать 300–700 мкм по высоте. Тем не менее формирование цепочек вторичной колонизации происходило по «кряжам» и краям каверн во фронтальной поверхности СВМПЭ по тому же принципу «паркетчатого» удвоения рядов, как у *K. amoena*, или путём увеличения числа клеток в цепочке в виде пучков. В-четвёртых, развитие особо крупных «плащевидных» поселений *H. coffeaeformis* чаще всего отмечали по краям крупных каверн (рис. 11), а более мелких — по верхним краям «лопастей» (на образце № 3) или же по «холмам» (на образцах № 1 и 2) (рис. 12). Ввиду разреженности цепочек первичной и вторичной колонизации, а также сетчатого характера «пятен» достоверно выделить их типичные размеры для *H. coffeaeformis* не представляется возможным.

Наконец, *H. symbifera* вовсе не формировала цепочек первичной колонизации для поиска топологически подходящих участков поверхности. Крупные клетки этого вида либо обосновывались на притенённых участках микрорельефа и давали там начало очень плотным, компактным колониальным поселениям (на образце № 3) (рис. 13), либо поселялись одиночно по краям каверн, среди густых поселений *H. coffeaeformis* (на образцах № 1 и 2) (рис. 12).

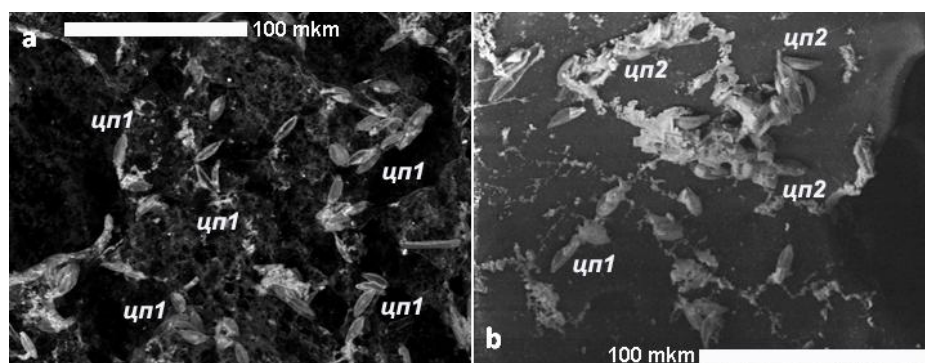


Рис. 10. Цепочки первичной (*цп1*) и вторичной (*цп2*) колонизации поверхности пористого СВМПЭ клетками *Halamphora coffeaeformis*

Fig. 10. Primary (*цп1*) and secondary (*цп2*) colonization chains of surface of porous UHMWPE by *Halamphora coffeaeformis* cells

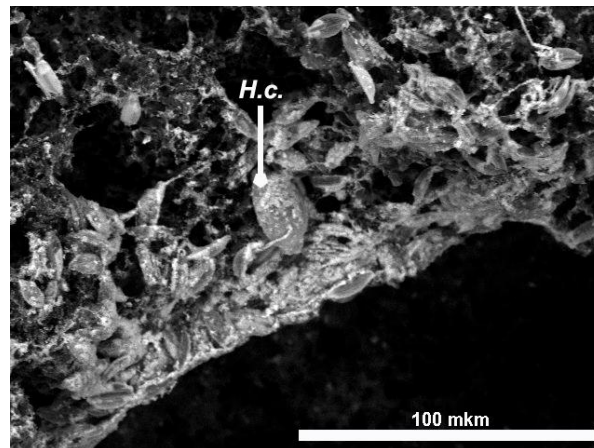


Рис. 11. Крупное «плащевидное» поселение *Halamphora coffeaeformis* по краю крупной каверны на фронтальной поверхности пористого СВМПЭ. В центре снимка — отдельная крупная клетка *H. symbifera* (H.c.)

Fig. 11. Large “cloak-like” settlement of *Halamphora coffeaeformis* along the edge of a large cavern on the frontal surface of porous UHMWPE. In the center of the image there is a separate large cell of *H. coffeaeformis* (H.c.)

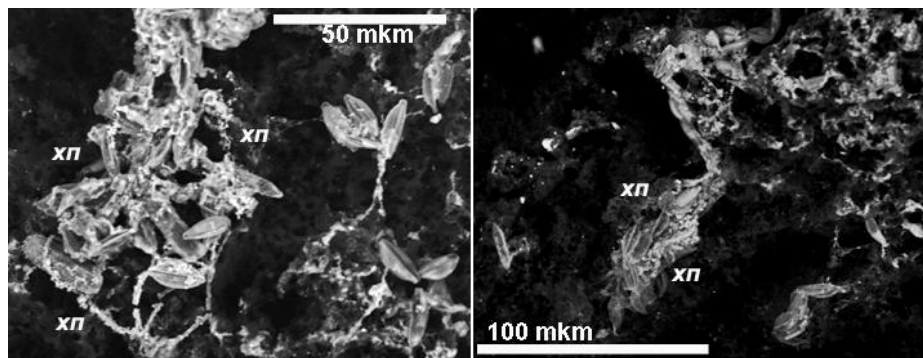


Рис. 12. Небольшие «плащевидные» поселения *Halamphora coffeaeformis* по вершинам холмовидных поднятий (хп) густоскладчатой поверхности пористого СВМПЭ

Fig. 12. Small “cloak-like” *Halamphora coffeaeformis* settlements along the tops of hill-shaped uplifts (хп) of the densely folded surface of porous UHMWPE

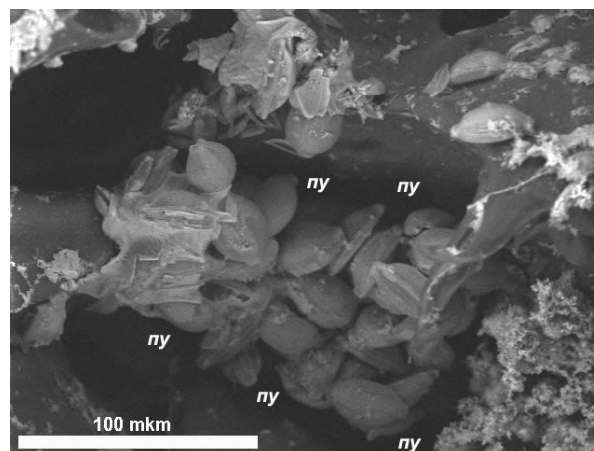


Рис. 13. Плотное и компактное колониальное поселение *Halamphora symbifera* на притенённом («пещеристом») участке (ny) микро рельефа пористого СВМПЭ

Fig. 13. Dense and compact *Halamphora symbifera* colonial settlement in the shaded (“cavernous”) area (ny) of porous UHMWPE microrelief

Размеры компактных поселений *H. symbifera* варьировали от 6 до 32 клеток (в среднем — 17,08). Преобладали группы по 14–18 клеток (в общей сложности — 32 %).

Заключение. Результаты экспериментов по изучению обрастания диатомеями образцов сверхвысокомолекулярного полиэтилена разного давления с разной структурой микрорельефа поверхности позволили выявить ряд общих характеристик процесса. Обрастания поверхности гладкого СВМПЭ не произошло. Образцы пористого СВМПЭ колонизировали клетки с различной морфологией — ахнантоиды (*Karayevia amoena*) и амфороиды (*Halamphora* spp.), обладающие неодинаковыми механизмами адгезии к поверхности субстрата, но проявившие общие стратегии при освоении отличающихся по микрорельефу образцов. Для видов близких размеров (*K. amoena* и *H. coffeaeformis*, размерный класс ≈ 10 –18 мкм) выявлены три общие последовательные стадии формирования колониальных поселений: 1) цепочки первичной колонизации, с помощью которых клетки расселялись по субстрату; 2) цепочки вторичной, или плоскостной, колонизации; 3) распростёртые, или «плащевидные», поселения, сформированные из «пятен».

Первая и вторая стадии колонизации распространялись преимущественно по выступающим элементам микрорельефа, а третья — на участках относительно ровных или же испещрённых мельчайшими, густо расположенными складками, где каждая клетка присоединялась сразу к двум-тремя складкам. На участках с максимально плотной складчатостью или с относительно гладкой поверхностью оба вида формировали обширные «плащевидные» поселения, наиболее обильные на приподнимающихся над общим уровнем фронтальной поверхности «холмах» и «лопастях». На всех образцах, где минимальный повторяющийся участок складчатой поверхности был сопоставим по площади с размерами клеток (от $\approx 10 : 1$ до $\approx (50 \dots 100) : 1$), отмечено формирование «пятен» из более-менее определённого числа клеток, своим расположением повторяющих особенности микрорельефа и образующих «плащевидные» поселения.

Для *K. amoena* впервые отмечена способность к модификации поверхности СВМПЭ — за счёт крайне плотного прикрепления клеток к субстрату и, как следствие, растягивания этой поверхности при увеличении числа рядов клеток. В одних случаях модификация выражалась в точечном растягивании краевых зон мельчайших ровных участков, пригодных для разрастания распростёртых поселений. В других случаях трансформация заключалась в выжимании поверхности участка в форме кольца и в дальнейшем формировании «горшка» с выпуклыми стенками.

На поверхности образца с минимальной складчатостью *H. coffeaeformis* (размерный класс ≈ 10 –18 мкм) использовали для крупных компактных поселений притенённые участки — по краям каверн, во вмятинах по изгибам «лопастей» и на узких перешейках между кавернами. В этом случае площадь минимального относительно однородного участка значительно превосходила площадь клеток данного размерного класса; они предпочитали участки, защищённые от движения воды и прямого освещения. Более крупные клетки *H. symbifera* (размерный класс ≈ 30 –35 мкм) при минимальной складчатости также уходили в «тень», но использовали более сопоставимые с собой по площади участки на дне неглубоких каверн.

Таким образом, выявлено, что при колонизации различных образцов пористого СВМПЭ диатомовые водоросли образуют устойчивые, плотно ассоциированные с поверхностью поселения, морфология которых тесно связана с особенностями микрорельефа поверхности. При соответствующей обработке полученных композитов, позволяющей избавляться от органического содержимого клеток диатомей и очищать их панцири, становится возможным получение образцов СВМПЭ с устойчиво биоминерализованной поверхностью, суммарная площадь которой на несколько порядков больше площади первоначальной поверхности.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке грантов Лондонского королевского общества (№ IEC/R2/170223) и Российского фонда фундаментальных исследований (№ 19-55-80004).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Азовский А. И. *Пространственно-временные масштабы организации морских донных сообществ* : дис. ... д-ра биол. наук. Москва : МГУ, 2003. 291 с. [Azovsky A. I. *Prostranstvenno-vremennyye masshtaby organizatsii morskikh donnykh soobshchestv*. [dissertation]. Moscow : MGU, 2003, 291 p. (in Russ.)]
2. Artham T., Doble M. Biodegradation of aliphatic and aromatic polycarbonates. *Macromolecular Bioscience*, 2008, vol. 8, iss. 1, pp. 14–24. <https://doi.org/10.1002/mabi.200700106>
3. Bukhtiyarova L. N. Additional data on the diatom genus *Karayevia* and a proposal to reject the genus *Kolbesia*. *Nova Hedwigia, Beiheft*, 2006, vol. 130, pp. 85–96.
4. Carson H. S., Nerheim M. S., Carroll K. A., Eriksen M. The plastic-associated microorganisms of the North Pacific Gyre. *Marine Pollution Bulletin*, 2013, vol. 75, iss. 1–2, pp. 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.07.054>
5. Dussud C., Hudec C., George M., Fabre P., Higgs P., Bruzard S., Delort A.-M., Eyheraguibel B., Meistertzheim A.-L., Jacquin J., Cheng J., Callac N., Odobel Ch., Rabouille S., Ghiglione J.-F. Colonization of non-biodegradable and biodegradable plastics by marine microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 2018, vol. 9, article 1571 (13 p.). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01571>
6. Eich A., Mildenerger T., Laforsch C., Weber M. Biofilm and diatom succession on polyethylene (PE) and biodegradable plastic bags in two marine habitats: Early signs of degradation in the pelagic and benthic zone? *PLoS ONE*, 2015, vol. 10, no. 9, article e0137201 (16 p.). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137201>
7. Fisher J., Dunbar M. J. Towards a representative periphytic diatom sample. *Hydrology and Earth System Sciences*, 2007, vol. 11, iss. 1, pp. 399–407. <https://doi.org/10.5194/hess-11-399-2007>
8. Freedman D., Diaconis P. On the histogram as a density estimator: L_2 theory. *Zeitschrift für Wahrscheinlichkeitstheorie und Verwandte Gebiete*, 1981, vol. 57, iss. 4, pp. 453–476.
9. GUR® UHMW-PE ultra high molecular weight polyethylene. URL: <https://www.celanese.com/engineered-materials/products/gur-uhmw-pe.aspx> (accessed 01.06.2020).
10. Kingston J. C. Araphid and monoraphid diatoms. In: *Freshwater Algae of North America. Ecology and Classification* / J. D. Wehr, R. G. Sheath (Eds). San Diego : Academic Press, 2003, pp. 595–636.
11. Levkov Z. *Amphora sensu lato*. In: *Diatoms of Europe* / H. Lange-Bertalot (Ed.). Ruggell : A. R. G. Gantner Verlag K. G., 2009, vol. 5, 916 p.
12. Maksimkin A. V., Kaloshkin S. D., Tcherdynstev V. V., Chukov D. I., Stepashkin A. A. Technologies for manufacturing ultrahigh molecular weight polyethylene based porous structures for bone implants. *Biomedical Engineering*, 2013, vol. 47, no. 2, pp. 73–77. <https://doi.org/10.1007/s10527-013-9338-5>
13. Maksimkin A. V., Senatov F. S., Anisimova N. Yu., Kiselevskiy M. V., Zalepugin D. Yu., Chernyshova I. V., Tilkunova N. A., Kaloshkin S. D. Multilayer porous UHMWPE scaffolds for bone defects replacement. *Materials Science and Engineering: C*, 2017, vol. 1, no. 73, pp. 366–372. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.104>
14. Mejdandžić M., Ivanković T., Pfannkuchen M., Godrijan J., Pfannkuchen D. M., Hrenović J., Ljubešić Z. Colonization of diatoms and bacteria on artificial substrates in the northeastern coastal Adriatic Sea. *Acta Botanica Croatica*, 2015, vol. 74, iss. 2, pp. 407–422. <https://doi.org/10.1515/botcro-2015-0030>
15. Nenadović T., Šarčević T., Čižmek H., Godrijan J., Pfannkuchen D. M., Pfannkuchen M., Ljubešić Z. Development of periphytic diatoms on different artificial substrates in the Eastern Adriatic Sea. *Acta Botanica Croatica*, 2015, vol. 74, iss. 2, pp. 377–392. <https://doi.org/10.1515/botcro-2015-0026>
16. Penna A., Magnani M., Fenoglio I., Fubini B., Cerrano C., Giovine M., Bavestrello G. Marine diatom growth on different forms of particulate silica: Evidence of cell/particle interaction. *Aquatic Microbial Ecology*, 2003, vol. 32, iss. 3, pp. 299–306. <https://doi.org/10.3354/ame032299>
17. Richard C., Mitbavkar S., Landoulsi J. Diagnosis of the diatom community upon biofilm development on stainless steels in natural freshwater. *Scanning*, 2017, article 5052646 (13 p.). <https://doi.org/10.1155/2017/5052646>
18. Round F. E., Crawford R. M., Mann D. G. *Diatoms: Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge : Cambridge University Press, 1990, 747 p.
19. Sala S. E., Sar E. A., Hinz F., Sunesen I. Studies on *Amphora* subgenus *Halamphora* (Bacillariophyta): The revision of some species described

- by Hustedt using type material. *European Journal of Phycology*, 2006, vol. 41, iss. 2, pp. 155–167. <https://doi.org/10.1080/09670260600556609>
20. Sheik S., Chandrashekar K. R., Swaroop K., Somashekarappa H. M. Biodegradation of gamma irradiated low density polyethylene and polypropylene by endophytic fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2015, vol. 105, pp. 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.08.006>
21. Senatov F. S., Anisimova N. Yu., Kiselevskiy M. V., Kopylov A. N., Tcherdyntsev V. V., Maksimkin A. V. Polyhydroxybutyrate/Hydroxyapatite highly porous scaffold for small bone defects replacement in the nonload-bearing parts. *Journal of Bionic Engineering*, 2017, vol. 14, iss. 4, pp. 648–658. [https://doi.org/10.1016/S1672-6529\(16\)60431-6](https://doi.org/10.1016/S1672-6529(16)60431-6)
22. Shah A. A., Hasan F., Hameed A., Ahmed S. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 2008, vol. 26, iss. 3, pp. 246–265. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>
23. Tokiwa Y., Calabia B. P., Ugwu C. U., Aiba S. Biodegradability of plastics. *International Journal of Molecular Sciences*, 2009, vol. 10, iss. 9, pp. 3722–3742. <https://doi.org/10.3390/ijms10093722>
24. Totti C., Cucchiari E., De Stefano M., Pennesi C., Romagnoli T., Bavestrello G. Seasonal variations of epilithic diatoms on different hard substrates, in the northern Adriatic Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2007, vol. 87, iss. 3, pp. 649–658. <https://doi.org/10.1017/S0025315407054665>
25. Xing Y., Yu L., Wanga X., Jiaa J., Liua Y., Hec J., Jia Z. Characterization and analysis of *Coscinodiscus* genus frustule based on FIB-SEM. *Progress in Natural Science: Materials International*, 2017, vol. 27, iss. 3, pp. 391–395. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2017.04.019>
26. Zettler E. R., Mincer T. J., Amaral-Zettler L. A. Life in the “plastisphere”: Microbial communities on plastic marine debris. *Environmental Science and Technology*, 2013, vol. 47, iss. 13, pp. 7137–7146. <https://doi.org/10.1021/es401288x>

FEATURES OF FORMATION OF COLONIAL SETTLEMENTS OF MARINE BENTHIC DIATOMS ON THE SURFACE OF SYNTHETIC POLYMER

Ph. V. Sapozhnikov¹, A. I. Salimon², A. M. Korsunsky^{2,3}, O. Yu. Kalinina^{1,4},
F. S. Senatov⁵, E. S. Statnik², and Ju. Cvjetinovic²

¹P. P. Shirshov Institute of Oceanology, Moscow, Russian Federation

²Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russian Federation

³University of Oxford, Oxford, United Kingdom

⁴Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

⁵National University of Science and Technology “MISIS”, Moscow, Russian Federation

E-mail: fil_aralsky@mail.ru

The topic of interactions between plastic and natural communities is now more relevant than ever before. Gradual accumulation of artificial polymer products and their fragments in the natural environment has reached a level at which it is already impossible to ignore the affect of these materials on living organisms. First and foremost, microorganism colonies inhabiting different biotopes, both aquatic and terrestrial, have been affected. These species are at the front-end of interaction with plastic, including those present in marine ecosystems. Nevertheless, in order to understand these processes, it is necessary to take into account several aspects of such interactions: the impact of different types of plastic on microbial community through the release of their decomposed products into the environment, the forms of plastic usage by microorganisms themselves, including mechanisms for surface colonization, as well as possible biodegradation processes of polymers due to the actions of microorganisms. At the same time, types of plastic may differ not only in mechanical strength, but also in their resistance to biodegradation caused by microorganisms. Experiments with surface colonization of types of plastic, which are different in composition and mechanical strength, provide a wide range of results that are not just relevant for understanding modern natural processes involving plastic: these results are also important for application in certain areas of technology development (for example, when creating composite materials). In particular, researches into the forms

and mechanisms of sustainable colonization of particularly strong polymers by diatoms from natural communities are of great interest. Due to the fouling of surface of particularly strong synthetic polymers by diatoms, it is possible to form a single diatom-polymeric composite with general properties being already substantially different from those of the polymer itself. For example, when a polymer is fouled with diatoms that are firmly held on its surface due to physiological mechanisms that ensure their reliable fixation, total surface area of the composite increases by 2–3 orders of magnitude compared with this of bare polymer. Such composites and their properties are formed due to mechanisms of substrate colonization used by diatoms from natural marine cenoses – during the transfer of these mechanisms to a new material being prospective for diatom settlement. The practical applications of these composites lie in the sphere of heat and sound insulation, as well as in the field of creating prosthetic tissues for bone operations. In our experiments, we tracked the sequence of development of a stable composite when diatoms colonized the surface of samples of a particularly strong synthetic polymer being resistant to corrosion. In this case, the sample population process took place on the basis of colonies formed in accumulative cultures from the natural marine environment. Samples of ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE) with a smooth and porous surface structure (with an open cell, bulk porosity up to 80 %) were colonized by diatoms *Karayevia amoena* (Hust.) Bukht., 2006, *Halamphora coffeaeformis* (C. Agardh) Levkov, 2009, and *Halamphora cymbifera* (W. Greg.) Levkov, 2009. These laboratory experiments lasted for three weeks. Accumulative microphyte cultures, on the basis of which the experiments were conducted, were obtained from the Baltic Sea (Baltiysk area, Russia) and the Arabian Sea (Mumbai area, India). The types and stages of development of colonial settlements on various elements of the frontal surface microrelief and in the underlying caverns were studied using a scanning electron microscope on samples subjected to stepwise thermal drying. Individual cells of *K. amoena*, *H. coffeaeformis*, and *H. cymbifera*, their chain-like aggregates, and outstretched colonial settlements occupied varying in degree non-homogeneous microrelief surface elements, forming structures with a thickness of 1–2 layers with an average settlement height of 1–1.3 single specimen height. *K. amoena* cells were tightly fixed to the polymer substrate using the pore apparatus of the flap of the frustule. Observations using scanning electron microscope revealed shell imprints on the substrate, which were signs of a polymer substrate introduction into hypotheca areoles. The spread mechanisms of diatoms of three mentioned species on various elements of UHMWPE surface were explored, as well as the formation of the characteristic elements of colonial settlements, including for *K. amoena* – consecutively in the form of “pots” and spheres, by means of interaction with polymer surface and its extension with the increase in the number of tightly attached cells in the colonial settlement.

Keywords: diatoms, diatom algae, Bacillariophyta, plastic colonization, UHMWPE, sustainable materials, plastic in the marine environment, aquaculture

ЗАМЕТКИ

УДК 593.8:535

РЕАКЦИЯ ЛИЧИНОК *MNEMIOPSIS LEIDYI* НА ИЗМЕНЕНИЕ ОСВЕЩЁННОСТИ

© 2020 г. Ю. С. Баяндина

Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,
Севастополь, Российская Федерация
E-mail: sepulturka@mail.ru

Поступила в редакцию 24.12.2019; после доработки 24.12.2019;
принята к публикации 26.06.2020; опубликована онлайн 30.06.2020.

Экспериментально изучены возможные реакции на свет личинок черноморского гребневика *Mnemiopsis leidy* двух возрастных групп (первые-четвёртые сутки и одна-две недели после вылупления). Личинок помещали в ёмкость с морской водой, в которой с помощью источника света и непрозрачного фона создавали световые две зоны (свет и тень); количество личинок регистрировали в каждой зоне в течение часа после начала эксперимента. Показано, что в среднем 77 % личинок, находящихся на ранних стадиях развития (первые-четвёртые сутки), через час мигрируют в тёмную область. Высказано предположение о наличии отрицательного фототаксиса у ранних личинок *Mnemiopsis leidy*. Подобные реакции у более взрослых личинок (одна-две недели) не обнаружены.

Ключевые слова: *Mnemiopsis leidy*, гребневик, личинки, фототаксис, миграции

Гребневика — планктонные хищные желетелые морские животные. Вид *Mnemiopsis leidy* относится к отряду Лопастеносных, представители которого передвигаются за счёт создания тока воды гребными пластинами, сформированными из ресничек. Синхронное движение ресничек координируется нервной системой [6]. Комплекс аборального органа — основная сенсорная структура гребневика; он контролирует движение и, возможно, является световым сенсором.

Развитие *Mnemiopsis leidy* — прямое, однако после вылупления личинка проходит цидиппидную планктонную стадию (длина тела — от 0,3 см (при вылуплении) до 3 см); личинка обладает парой длинных ветвящихся щупалец и активно передвигается в толще воды (рис. 1). По мере своего развития личинка мнемииопсиса приобретает особенности организации, присущие половозрелой особи (от 3 до 15 см): редуцируются щупальца, появляются характерные длинные лопасти [4].

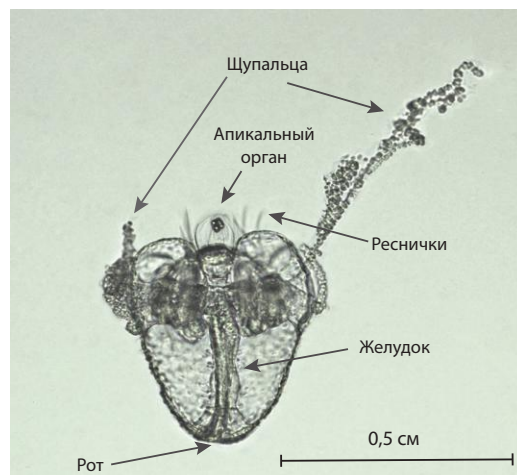


Рис. 1. Личинка *Mnemiopsis leidy* на первые сутки после вылупления
Fig. 1. *Mnemiopsis leidy* larvae on the first day after hatching

Современные систематики считают гребневиков «сестринским таксоном» по отношению ко всем остальным многоклеточным животным; развитие их нервной и мышечной систем уникально [3]. Выявление наличия поведенческих реакций личинок гребневиков на изменение освещённости важно для понимания работы этих систем.

Ранее Шницлером с соавторами [5] проведён всесторонний анализ генов, участвующих в производстве и поглощении света у личинок *Mnemiopsis leidyi*; показано, что экспрессия генов опсина, участвующих в восприятии света, происходит в апикальном сенсорном органе, а именно в нервных цилиарных клетках. Также выявлена совместная локализация экспрессии генов фотопротеина и двух генов опсина в развивающихся фоточитах *Mnemiopsis leidyi*. Авторы предположили, что существует связь между биолюминесценцией и фототаксисом у гребневиков, и фоточиты, вероятно, не только излучают, но и воспринимают свет [5].

По результатам исследования [1], высказано предположение, что одним из факторов, стимулирующих *Mnemiopsis leidyi* к совершению вертикальных миграций, является избегание яркого света (свыше $10 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{сек}^{-1}$). Установлено, что миграции в толще воды совершают только мелкие гребневики (до 22 мм). Авторы считают, что животные поднимаются в верхние слои лишь в тёмное время суток вслед за пищевыми объектами, а в дневные часы опускаются ниже, избегая солнечного света.

Сведений о лабораторных экспериментах по исследованию реакций гребневиков на свет в литературе нами не обнаружено.

Цель данной работы — изучить влияние освещённости на поведение личинок гребневика *Mnemiopsis leidyi*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Взрослых особей *Mnemiopsis leidyi* отбирали в море с причального сооружения аквариального корпуса ФИЦ ИнБЮМ на выходе из бух. Карантинная (г. Севастополь) в сентябре 2019 г. Животных доставляли в лабораторию, помещали в 5-литровые ёмкости с морской водой (5–7 особей на одну ёмкость) и оставляли на ночь в затемнённом помещении. Наутро наблюдали появление яиц и личинок. В первые сутки после вылупления личинок перемещали с помощью пипетки в отдельные стеклянные стаканы объёмом 0,5 л. Эксперименты проводили на личинках на ранних стадиях развития (возраст — от одних до четырёх суток). Их содержали в морской воде комнатной температуры (+22 °С); кормовые объекты не вносили. Для каждого следующего опыта отбирали личинок, не участвовавших в экспериментах ранее.

Над источником света на матовое стекло помещали малую чашку Петри (диаметр — 10 см, высота — 1 см), заполненную фильтрованной морской водой. В качестве источника света использовали светодиодный элемент, установленный на расстоянии, при котором вода в чашке не нагревалась. Под чашку подкладывали чёрный непрозрачный фон так, чтобы одна её половина была затемнена, а вторая оставалась полностью освещённой (рис. 2). На границе свет — тень устанавливали непрозрачную перегородку из пластика. Помещали 20 личинок мнемииопсиса со стороны освещённой части, затем убрали перегородку. Наблюдали за поведением личинок в течение часа после начала эксперимента, подсчитывали их количество в тёмной и освещённой частях чашки. Эксперименты проводили в течение четырёх дней после вылупления личинок, по 5 повторностей в каждые сутки; всего — 20 экспериментов.

В 110-м рейсе НИС «Профессор Водяницкий» (4–20 октября 2019 г.) в Азовском море планктонной сетью удалось отобрать более крупных личинок, размером от 1 до 2 см (предположительный их возраст — 1–2 недели). Изучение реакций на свет проводили при тех же условиях эксперимента в лаборатории биоразнообразия и функциональной геномики Мирового океана (далее — БиФГМО) на борту судна; всего — 10 экспериментов.

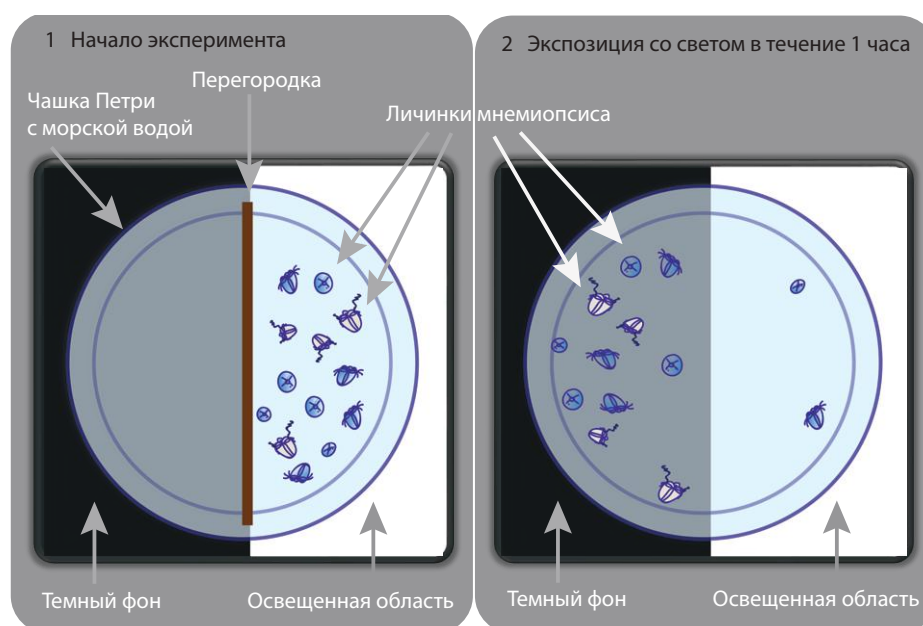


Рис. 2. Схема эксперимента. 1 — начало эксперимента: чашка Петри с морской водой помещена над источником света, под половину чашки подложен тёмный фон, на границе свет — тень установлена перегородка, личинки мнемииопсиса помещены в светлую область. 2 — экспозиция личинок в чашке без перегородки в течение часа после начала эксперимента

Fig. 2. Scheme of the experiment. 1 – start of the experiment: the Petri dish with seawater is placed above the light source, a black opaque background is placed under one half of the dish, a partition is installed at the light – dark border, *Mnemiopsis* larvae are placed in the light area. 2 – exposure of larvae in a dish without partition for one hour after the start of the experiment

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наблюдения за поведением личинок, находящихся на ранних этапах развития, в течение часа после начала эксперимента показали, что на протяжении первых 30 минут личинки мигрируют по всему объёму чашки, а через 1 час около 77 % уходят в затемнённую область, избегая яркого света (табл. 1).

Таблица 1. Доля личинок, находящихся в тёмной зоне чашки Петри через 1 час после начала экспериментов

Table 1. Percentage of larvae in the dark area of the Petri dish within one hour after the start of the experiments

Возраст личинок, сутки	<i>n</i>	Доля личинок, находящихся в тёмной зоне, %
1	5	85
2	5	64
3	5	76
4	5	83
За всё время	20	77

Реакция на изменение освещённости у личинок, находящихся на ранних стадиях развития, проявляется не мгновенно, а с течением времени. Резкое изменение освещённости запускает каскад внутренних физиологических и биохимических процессов животного, на которые затрачивается определённое время. Известно, что механизм фототаксиса всех эукариот включает три основных этапа [2]: 1) поглощение света и первичные реакции в фоторецепторах; 2) преобразование стимулов и передачу сигналов к двигательному аппарату; 3) изменение движения.

Таким образом, можно предположить, что личинки *Mnemiopsis leidyi* на ранних этапах развития обладают отрицательным фототаксисом.

Для более взрослых личинок не удалось достоверно установить наличие реакции на свет. В одних экспериментах практически все личинки мигрировали в тёмную область чашки в течение часа, в других — занимали весь объём чашки и не перемещались даже по прошествии двух часов после начала эксперимента.

В связи с тем, что личинки *Mnemiopsis leidyi* совершают выраженные вертикальные миграции в водной толще, возможно, более крупным личинкам для свободного перемещения не хватает объёма воды в чашке Петри. Для выявления их вероятных реакций на изменение освещённости необходимы другие условия эксперимента.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по темам «Структурно-функциональная организация, продуктивность и устойчивость морских пелагических экосистем» (№ гос. регистрации АААА-А18-118020790229-7) и «Закономерности формирования и антропогенная трансформация биоразнообразия и биоресурсов Азово-Черноморского бассейна и других районов Мирового океана» (№ гос. регистрации АААА-А18-118020890074-2).

Благодарность. Автор благодарит вед. инженера лаборатории БиФГМО ФИЦ ИнБЮМ Кирина М. П. за отбор и доставку в лабораторию взрослых особей гребневиков; сотрудника отдела планктона ФИЦ ИнБЮМ Доценко В. С. — за отбор личинок мнемииопсиса в 110-м рейсе НИС «Профессор Водяницкий»; с. н. с. лаборатории БиФГМО к. б. н. Кривенко О. В. — за ценные рекомендации при написании заметки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Haraldsson M., Båmstedt U., Tiselius P., Titelman J., Aksnes D. L. Evidence of diel vertical migration in *Mnemiopsis leidyi*. *PLoS One*, 2014, vol. 9, iss. 1, article e86595 (10 p.). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086595>
2. Jekely G. Evolution of phototaxis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2009, vol. 364, iss. 1531, pp. 2795–2808. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0072>
3. Moroz L., Kevin L., Kocot M., Citarella M. R. et al. The ctenophore genome and the evolutionary origins of neural systems. *Nature*, 2014, vol. 510, no. 7503, pp. 109. <https://doi.org/10.1038/nature13400>
4. Rapoza R., Novak D., Costello J. H. Life-stage dependent, *in situ* dietary patterns of the lobate ctenophore *Mnemiopsis leidyi* Agassiz, 1865. *Journal of Plankton Research*, 2005, vol. 27, no. 9, pp. 951–956. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbi065>
5. Schnitzler C. E., Pang K., Powers M. L., Reitzel A. M., Ryan J. F., Simmons D., Tada T., Park M., Gupta J., Brooks S. Y., Blakesley R. W., Yokoyama S., Haddock S. H. D., Martindale M. Q., Baxevanis A. D. Genomic organization, evolution, and expression of photoprotein and opsin genes in *Mnemiopsis leidyi*: A new view of ctenophore photocytes. *BMC Biology*, 2012, vol. 10, pp. 107. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-107>
6. Tamm S. L. Cilia and the life of ctenophores. *Invertebrate Biology*, 2014, vol. 133, iss. 1, pp. 1–46. <https://doi.org/10.1111/ivb.12042>

RESPONSE OF *MNEMIOPSIS LEIDYI* LARVAE TO LIGHT INTENSITY CHANGES

Yu. S. Baiandina

A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation
E-mail: sepulturka@mail.ru

A possible response to light of larvae of Black Sea ctenophore *Mnemiopsis leidyi* of two age groups (first to fourth day and one-two weeks after hatching) was experimentally studied. The larvae were placed in a Petri dish with seawater, in which two areas (light and dark) were created using a light source and a black opaque background. The number of larvae in each area was recorded for an hour after the start of the experiment. It was found that on average 77 % of the early stage larvae (first to fourth day) migrated to the dark area after an hour. We hypothesized that *Mnemiopsis leidyi* early stage larvae have negative phototaxis. Similar response of the older larvae (one-two weeks) was not recorded.

Keywords: *Mnemiopsis leidyi*, ctenophore, larvae, phototaxis, migration

UDC 595.142.2(262.5)

**THE FINDING OF A RARE IN THE BLACK SEA POLYCHAETE
CTENODRILUS SERRATUS (SCHMIDT, 1857)
(ANNELIDA, CIRRATULIDAE)**

© 2020 E. V. Lisitskaya and N. A. Boltachova

A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation
E-mail: e.lisitskaya@gmail.com

Received by the Editor 21.11.2019; after revision 13.02.2020;
accepted for publication 26.06.2020; published online 30.06.2020.

In July 2019, three polychaetae specimens of the genus *Ctenodrilus* were found in oyster cages on silted oyster shells. The cages from a mussel-and-oyster farm located at the outer roadstead of Sevastopol Bay were suspended at a depth of 6–8 m. The bottom soil under the mussel-and-oyster farm is silted sand, and the depth is of 16 m. During the sampling, water temperature was of +23 °C, and the salinity was of 17.7 ‰. Thus, according to morphological characteristics, polychaetae we found should be classified as *Ctenodrilus serratus* (Schmidt, 1857). Photographs of alive and fixed polychaetae, chaetae patterns, and a schematic representation of their number by segments are presented. At the beginning of the XX century, a single specimen of this species was found in the Black Sea.

Keywords: polychaetae, *Ctenodrilus serratus* (Schmidt, 1857), Black Sea

There is only one known representative of the subfamily Ctenodrilinae of the family Cirratulidae in the Black Sea – *Ctenodrilus serratus* (Schmidt, 1857) [2 ; 3]. At the beginning of the XX century, a single specimen of this species was found in Sevastopol Bay in the fouling of a pipe near the military hospital at a depth of 1 m [1]. The respective specimen was probably lost. There were no further observations of this species in the Black Sea. All references to its presence in Black Sea fauna [2 ; 3] have been based on the first mention.

In July 2019, three specimens of polychaetae genus *Ctenodrilus* were found in oyster cages on silted oyster shells. The cages from the mussel-and-oyster farm located at the outer roadstead of Sevastopol Bay (44°37'13.3"N, 33°30'07.1"E) were suspended at a depth of 6–8 m. The substrate under the farm is silted sand, and the depth is of 16 m. During the sampling, water temperature was of +23 °C, and the salinity was of 17.7 ‰. Optical microscopes Mikmed-5, MBS-9, and Olympus CX-41 were used to identify these specimens. The photographs were taken by cameras Canon Digital IXUS 90 IS and Sony Cyber-Shot 16.2. Gathered material is lodged in IBSS RAS collection (IBSS-POL / Cirratulidae / No. 7).

The polychaetes have 11–12 segments; their body width is of 0.12–0.13 mm, and the length is of 1.25–1.5 mm (Fig 1A, B). Alive specimens: translucent body with a greenish tint; black-purple dots throughout the body; red intestines visible. Fixed specimens in 4 % formalin solution: light-green; with red stomach.

Prostomium round-conical. Eyes, head appendages, and gills absent. Prostomium and peristomium ciliated ventrally. Peristomium and last segment without chaetae. Parapodia not developed; chaetae in two bundles come directly from body side. All chaetae simple, of the same shape – distally expanded. Expanded part of hooks on one side has 5–6 large triangular teeth; all teeth of nearly the same size (Fig. 2A).

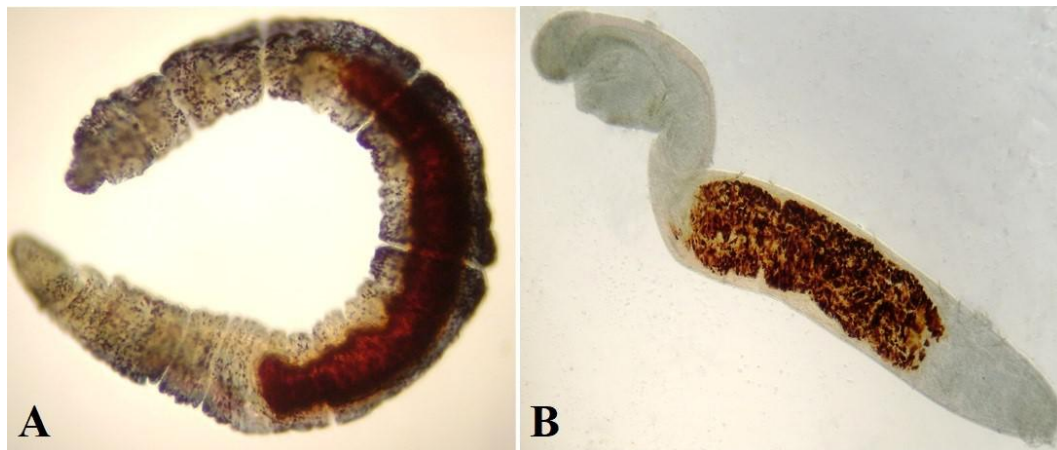


Fig. 1. *Ctenodrilus serratus* (IBSS-POL / Cirratulidae / No. 7): A – alive specimen; B – formalin-fixed specimen

Рис. 1. *Ctenodrilus serratus* (IBSS-POL / Cirratulidae / № 7): А — живая особь; В — фиксированный формалином червь

Variable number (1 to 4) of chaetae is in the noto- and neuropodial bundles in different chaetigers (Fig. 2B). Intestine with an expansion from chaetiger 3 to the beginning of chaetiger 6. Pygidium rounded, without cirri.

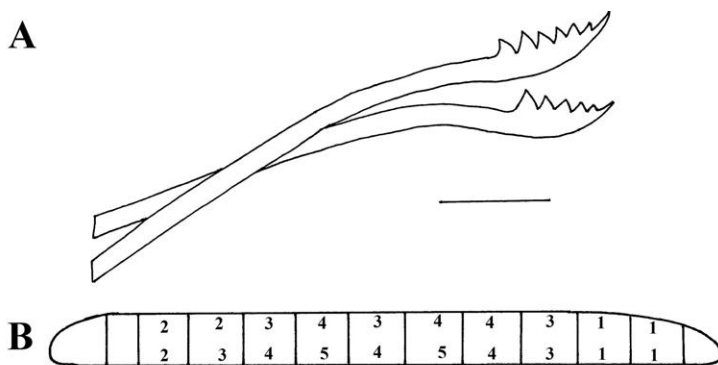


Fig. 2. A – chaetae of observed specimen *Ctenodrilus serratus*, scale bar 10 μm; B – schematic representation of the number of chaetae in chaetigers of *C. serratus* in notopodia (upper row) and neuropodia (lower row)

Рис. 2. А — щетинки исследованного экземпляра *Ctenodrilus serratus*, размерная шкала: 10 мкм; В — схема количества щетинок в сегментах тела у *C. serratus* в нотоподиях (верхний ряд) и невроподиях (нижний ряд)

Morphological characteristics of the polychaetes we have found fit the description of *Ctenodrilus serratus* (Schmidt, 1857) [5]. The subfamily Ctenodrilinae includes two genera – *Aphropharynx* Wilfert, 1974 and *Ctenodrilus* Claparède, 1863. The main difference between these genera is chaetal morphology. *Aphropharynx* representatives have three types of simple chaetae: trichoid, serrated with small teeth, and serrated with large teeth, whereas *Ctenodrilus* representatives have only one type of chaetae – hooks [7 ; 8].

The genus *Ctenodrilus* includes four species. Validity of one of them (*Ctenodrilus paucidentatus* Ben-Eliahu, 1976) is doubtful. *Ctenodrilus parvulus* Scharff, 1887 is characterized by the presence of only smooth chaetae without teeth [4]. Recently described species *Ctenodrilus pacificus* Magalhães, Weidhase, Schulze & Bailey-Brock, 2016 from the Pacific Ocean (Hawaii) is morphologically quite similar to *C. serratus*, and main differences between these species are found at the molecular level [4].

C. serratus is the most common species of the genus *Ctenodrilus*. According to numerous indications of its presence in various water areas (Pacific, Atlantic oceans to Mediterranean Sea, English Channel, and Helgoland), this species appears to be spread worldwide. Due to lack of molecular data in most reports, it is not known whether this species is a cosmopolitan one or a complex of potentially cryptic species. Representatives of the genus *Ctenodrilus* found in oyster cages of a farm in South Africa and identified

as *C. serratus* according to molecular studies were identical to *C. serratus* from the North Sea [6]. Taking into account that molecular studies of Black Sea *Ctenodrilus* have not been carried out, the specimens we found can be tentatively classified as *C. serratus*.

This work was carried out within the framework of government research assignments of IBSS RAS "Investigation of the mechanisms of controlling production processes in biotechnological complexes with the aim of developing the scientific foundations for the production of biologically active substances and technical products of marine genesis" (No. AAAA-A18-118021350003-6) and "Patterns of formation and anthropogenic transformation of biodiversity and biological resources of the Azov Sea – the Black Sea basin and other parts of the World Ocean" (No. AAAA-A18-118020890074-2).

REFERENCES / СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jakubova L. I. List of Archannelidae and Polychaeta of the Sevastopol Bay of the Black Sea. *Izvestiya Akademii nauk SSSR*, 1930, no. 9, pp. 863–881. (in Russ.)
2. Kisseleva M. I. *Polychaetes (Polychaeta) of the Black and Azov Seas* / Russian Academy of Sciences, Murmansk Marine Biological Institute, Kola Science Centre. Apatity, 2004, 409 p. (in Russ.)
3. Kurt-Şahin G., Çinar M. E. A check-list of polychaete species (Annelida: Polychaeta) from the Black Sea. *Journal of the Black Sea / Mediterranean Environment*, 2012, vol. 18, no. 1, pp. 10–48. <https://doi.org/10.3906/zoo-1405-72>
4. Magalhães W. F., Weidhase M., Schulze A., Bailey-Brock J. H. Taxonomic remarks on the genus *Ctenodrilus* (Annelida: Cirratulidae) including description of a new species from the Pacific Ocean. *Zootaxa*, 2016, vol. 4103, no. 4, pp. 325–343. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4103.4.2>
5. Schmidt O. Zur Kenntnis der Turbellaria, Rhabdo-coela und einiger anderer Wuermer des Mittelmeeres. *Sitzungsberichte der Kaiserliche Akademie der Wissenschaften, Wien, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Klasse*, 1857, vol. 23, no. 2, pp. 347–366.
6. Weidhase M., Bleidorn Ch., Simon C. A. On the taxonomy and phylogeny of *Ctenodrilus* (Annelida: Cirratulidae) with a first report from South Africa. *Marine Biodiversity*, 2016, vol. 46, no. 1, pp. 243–252. <https://doi.org/10.1007/s12526-015-0355-3>
7. Wilfert M. Ein Beitrag zur Morphologie, Biologie und systematischen Stellung des Polychaeten *Ctenodrilus serratus*. *Helgoländer wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*, 1973, vol. 25, iss. 2–3, pp. 332–346.
8. Wilfert M. *Aphropharynx heterochaeta* nov. gen. nov. spec., ein neuer polychaet aus der familie Ctenodrilidae Kennel 1882. *Cahiers de Biologie Marine*, 1974, vol. 15, no. 4, pp. 495–504.

ОБНАРУЖЕНИЕ РЕДКОГО ДЛЯ ЧЁРНОГО МОРЯ ВИДА ПОЛИХЕТ *CTENODRILUS SERRATUS* (SCHMIDT, 1857) (ANNELIDA, CIRRATULIDAE)

Е. В. Лисицкая, Н. А. Болтачева

Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,
Севастополь, Российская Федерация
E-mail: e.lisitskaya@gmail.com

В июле 2019 г. в устричных садках на заиленных створках устриц обнаружены 3 экземпляра полихет рода *Ctenodrilus*. Садки с мидийно-устричной фермы, расположенной на внешнем рейде бухты Севастопольская, были подвешены на глубине 6–8 м. Грунт под фермой — заиленный песок, глубина — 16 м. Температура воды во время отбора материала составляла +23 °С, солёность — 17,7 ‰. Найденные полихеты по морфологическим признакам отнесены к виду *Ctenodrilus serratus* (Schmidt, 1857). Представлены фотографии живой и фиксированной полихеты, рисунки щетинок и схема их количества по сегментам. Данный вид в Чёрном море был отмечен единственный раз в начале XX века.

Ключевые слова: полихеты, *Ctenodrilus serratus* (Schmidt, 1857), Чёрное море

ХРОНИКА И ИНФОРМАЦИЯ

К ЮБИЛЕЮ АКАДЕМИКА РАН ВИКТОРА НИКОЛАЕВИЧА ЕГОРОВА

В мае 2020 г. исполнилось 80 лет Виктору Николаевичу Егорову — и. о. научного руководителя ФИЦ ИнБЮМ, академику Российской академии наук, доктору биологических наук, профессору, главному редактору «Морского биологического журнала». В. Н. Егоров разработал теорию минерального обмена между морскими организмами и водной средой, открыл струйные метановые газовыделения со дна Чёрного моря, создал основы биофизической теории экологической ёмкости морской среды в отношении загрязняющих веществ. Виктор Николаевич — автор более чем 360 статей и 6 монографий.



Сотрудники отдела радиационной и химической биологии ФИЦ ИнБЮМ поздравляют Виктора Николаевича Егорова с юбилеем! Мы гордимся тем, что работаем в одном коллективе с автором научных открытий и выдающимся учёным, внёсшим значительный теоретический и практический вклад в изучение гомеостаза морских экосистем.

Сегодня Виктор Николаевич, доктор биологических наук, профессор, действительный член Российской академии наук (с 2016) и Национальной академии наук Украины (с 2012), является и. о. научного руководителя Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН».

С 18-летнего возраста внимание В. Н. Егорова, коренного севастопольца, было приковано к морю: вначале — при работе на рыболовецких судах на Каспии, затем — при моделировании динамики движения атомных субмарин в Севастопольском высшем военноморском инженерном училище, а с 1968 г. — в ИнБЮМ. Виктор Николаевич через конкурсный отбор поступил сначала в отдел функционирования морских экосистем под руководством члена-корреспондента АН УССР Тамары Сергеевны Петипа, а позже — в отдел радиационной и химической биологии, возглавляемый Геннадием Григорьевичем Поликарповым.

За годы работы Виктор Николаевич неуклонно рос профессионально. В 1968–1970 г. он был старшим инженером, а затем (до 1980) — младшим научным сотрудником. В 1975 г. он блестяще защитил диссертацию и стал кандидатом физико-математических наук по специальности «геофизика» («физика моря»). Далее В. Н. Егоров работал в должности старшего научного сотрудника, а в 1983 г. стал заведующим лабораторией динамической радиохемозологии. В 1988 г. он защитил докторскую диссертацию по специальности «радиобиология». В 1989–1993 гг. Виктор Николаевич был заместителем директора ИнБЮМ по науке; параллельно (1991) он получил от Г. Г. Поликарпова, академика НАН Украины, штурвал управления ОРХБ. Руководя отделом в сложное для всех время (1990-е), В. Н. Егоров всегда принимал стратегически правильные решения и мастерски преодолевал трудности.



Г. Г. Поликарпов передаёт штурвал (символ руководителя ОРХБ) своему ученику, научному последователю и преемнику В. Н. Егорову

В те непростые годы Виктор Николаевич проявил себя как талантливый организатор международных морских исследований и руководитель творческого научного коллектива. Благодаря ему получено 16 международных грантов для изучения Чёрного моря, в рамках которых реализованы экспедиционные работы, финансируемые Евросоюзом, Международным агентством по атомной энергии, межправительственными фондами. В результате такого сотрудничества было обеспечено научное использование НИС «Профессор Водяницкий» и организовано выполнение до 70 % морских экспедиционных работ НАН Украины на Чёрном море в 1992–2005 гг.

В мировой науке об океане В. Н. Егорову принадлежит приоритет в нескольких направлениях: разработка теории минерального обмена между морскими организмами и водной средой; руководство исследованиями и обобщение их результатов по изучению отклика Чёрного моря на чернобыльскую аварию; открытие в конце 1980-х гг. струйных метановых газовыделений со дна Чёрного моря, которое произвело сенсацию в научном мире и положило начало многолетнему исследованию этого феномена. Им созданы основы биофизической теории экологической ёмкости морской среды в отношении загрязняющих веществ. На математических моделях исследованы условия устойчивости системы биотического самоочищения фотического слоя морских вод. Показано, что возрастание антропогенного загрязнения вод может приводить к изменению порядка скоростей метаболических реакций обмена загрязнителей морскими организмами с первого на нулевой, а также к насыщению сорбирующих поверхностей косного и биокосного вещества. При этом система комплексного биогеохимического самоочищения вод может терять устойчивость, что обуславливает повышение содержания загрязняющих веществ в водной среде до уровней, приводящих к токсическому воздействию на морские организмы.

Результаты научных исследований Виктора Николаевича всемирно признаны; они опубликованы в 365 статьях (из них более 70 — в иностранных изданиях) и 6 монографиях, которые высоко ценят и часто цитируют отечественные и зарубежные коллеги. Ученики В. Н. Егорова защитили под его руководством семь кандидатских диссертаций, посвящённых вопросам биогеохимии загрязняющих веществ различной природы в морских экосистемах, а также метановой проблеме. В арсенале педагогических воздействий Виктора Николаевича — талантливого учителя и чуткого, деликатного человека — нет методов принуждения: он увлекает работой, подаёт личный пример, делится не только своими знаниями, но и жизненным опытом, навыками и умениями, проявляет заинтересованность в работе учеников на всех её этапах, способствует их профессиональному росту.

В. Н. Егоров — прекрасный рассказчик. Его воспоминания о морских экспедициях всегда вызывают неподдельный интерес и удивляют множеством деталей и ярких подробностей. Виктор Николаевич — участник 45 морских научных рейсов, 22 из которых он возглавлял (16 из них — международные). За время научных экспедиций и командировок он посетил 53 страны мира, побывал в 24 морях Атлантического, Индийского и Тихого океанов, совершил кругосветное плавание.

Виктор Николаевич с детства увлекался рыбной ловлей и спустя годы стал владельцем катера, на котором долгое время вместе с коллегами из ОРХБ и других отделов института отбирал пробы воды, гидробионтов и донных отложений в прибрежных районах г. Севастополя от мыса Лукулл до мыса Фиолент. В одной из экспедиций на «Антаресе» гидроакустическим методом были открыты метановые сипы в прибрежной акватории г. Севастополя.



Команда катера «Антарес» после экспедиции в прибрежные воды г. Севастополя. Слева направо: В. Н. Поповичев, С. Б. Гулин, Н. А. Стокозов, шкипер «Антареса» В. Н. Егоров, Л. В. Малахова, И. Н. Мосейченко

Мы рады возможности учиться колоссальной работоспособности Виктора Николаевича, научной интуиции и присущим ему блестящим человеческим качествам — непреклонному оптимизму и удивительному чувству юмора. От всей души желаем новых достижений в научной работе, достойных учеников и последователей, счастья, благополучия, крепкого здоровья юбиляру и его близким!

Коллектив отдела радиационной и химической биологии ФИЦ ИнБЮМ

TO THE ANNIVERSARY OF ACADEMICIAN OF THE RAS VIKTOR EGOROV

This year, Viktor Egorov, IBSS Supervisor, Academician of the Russian Academy of Sciences, D. Sc., Prof., Editor-in-Chief of "Marine Biological Journal", celebrates the anniversary. He developed the theory of mineral metabolism between marine organisms and the aquatic environment, discovered jet methane gas emissions from the bottom of the Black Sea, and created the basics of the biophysical theory of the ecological capacity of the marine environment in relation to pollutants. Viktor Egorov is the author of more than 360 articles and 6 monographs.

Учредитель и издатель журнала:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр
«Институт биологии южных морей
имени А. О. Ковалевского РАН»
(ОГРН 1159204018478)

Соиздатель журнала:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Зоологический институт РАН

Рекомендовано к печати решением учёного совета
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра
«Институт биологии южных морей
имени А. О. Ковалевского РАН»
(протокол № 7 от 26.06.2020).

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи,
информационных технологий и массовых коммуникаций
(свидетельство о регистрации средства массовой информации
ПИ № ФС 77 - 76872 от 24.09.2019).

Выпускающий редактор номера:

д. б. н., проф. Довгаль И. В.

Корректор:

Копытова О. Ю.

Перевод:

Тренкеншу Т. А., Надточенко И. А.

Компьютерная вёрстка:

Баяндин А. С.

Оригинал-макет подготовлен в пакете \LaTeX (TeX Live 2015 / Debian Linux)
с использованием свободных шрифтов FreeSerif и FreeSans.

Материалы журнала доступны на условиях лицензии
Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International (CC BY-NC-SA 4.0).



Подп. к печати 26.06.2020	Дата выхода в свет 30.06.2020	Заказ № 2004372	Тираж 150 экз.
Формат 60 × 84/8	Уч.-изд. листов 9,3	Усл. печ. листов 10	Печать цифровая

Отпечатано в типографии: ИП Ермолов М. П., ОГРНИП 314920436710081 от 26.12.2014;
ул. Кулакова, д. 59, г. Севастополь, 299011;
тел.: +7 978 70-45-111; e-mail: print-e@yandex.ru.



Вниманию читателей!

*Институт биологии южных морей
имени А. О. Ковалевского РАН,
Зоологический институт РАН*

*издают
научный журнал*

**Морской биологический журнал
Marine Biological Journal**

*A. O. Kovalevsky Institute of Biology
of the Southern Seas of RAS,
Zoological Institute of RAS*

*publish
scientific journal*

**Морской биологический журнал
Marine Biological Journal**

- МБЖ — периодическое издание открытого доступа. Подаваемые материалы проходят независимое двойное слепое рецензирование. Журнал публикует обзорные и оригинальные научные статьи, краткие сообщения и заметки, содержащие новые данные теоретических и экспериментальных исследований в области морской биологии, материалы по разнообразию морских организмов, их популяций и сообществ, закономерностям распределения живых организмов в Мировом океане, результаты комплексного изучения морских и океанических экосистем, антропогенного воздействия на морские организмы и экосистемы.
- Целевая аудитория: биологи, экологи, биофизики, гидро- и радиобиологи, океанологи, географы, учёные других смежных специальностей, аспиранты и студенты соответствующих научных и отраслевых профилей.
- Статьи публикуются на русском и английском языках.
- Периодичность — четыре раза в год.
- Подписной индекс в каталоге «Пресса России» — Е38872. Цена свободная.
- MBJ is an open access, peer reviewed (double-blind) journal. The journal publishes original articles as well as reviews and brief reports and notes focused on new data of theoretical and experimental research in the fields of marine biology, diversity of marine organisms and their populations and communities, patterns of distribution of animals and plants in the World Ocean, the results of a comprehensive studies of marine and oceanic ecosystems, anthropogenic impact on marine organisms and on the ecosystems.
- Intended audience: biologists, ecologists, biophysicists, hydrobiologists, radiobiologists, oceanologists, geographers, scientists of other related specialties, graduate students, and students of relevant scientific profiles.
- The articles are published in Russian and English.
- The journal is published four times a year.
- The subscription index in the “Russian Press” catalogue is E38872. The price is free.

Заказать журнал

можно в научно-информационном отделе ИнБИОМ.
Адрес: ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН», пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация.
Тел.: +7 8692 54-06-49.
E-mail: mbj@imbr-ras.ru.

You may order the journal

in the Scientific Information Department of IBSS.
Address: A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, 2 Nakhimov avenue, Sevastopol, 299011, Russian Federation.
Tel.: +7 8692 54-06-49.
E-mail: mbj@imbr-ras.ru.