

**АНАЛИЗ ЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА ГОНАД, ПОЛОВЫХ ПРОДУКТОВ
И ЛИЧИНОК МИДИИ *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* В ПЕРИОД НЕРЕСТА**

© 2023 г. Л. Л. Капранова¹, *, В. И. Рябушко¹, С. В. Капранов¹

¹Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН, Севастополь, Россия

*E-mail: lar_sa1980@mail.ru

Поступила в редакцию 14.10.2022 г.

После доработки 25.01.2023 г.

Принята к публикации 09.02.2023 г.

В настоящей работе исследован элементный состав гонад, яйцеклеток, сперматозоидов и личинок мидии *Mytilus galloprovincialis* в период нереста, когда концентрации биологически активных и минеральных веществ максимальны. Сравнительный анализ концентраций показал, что элементы по-разному вовлечены в гаметогенез мидии. Отмечены значимые различия в содержании Li, B, Mg, Si, P, K, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Zn, Ge, As, Se, Br, Rb, Sr, Mo, Pd, Sn, I, Ba, Ce в гонадах самцов и самок до и после нереста, в половых продуктах и личинках мидии. Вероятно, некоторые из перечисленных элементов не только пассивно накапливаются в организме моллюсков, но и являются эссенциальными, будучи непосредственно вовлечены в процесс размножения. Больше всего значимых различий в элементном составе обнаружено между яйцеклетками и личинками, а также между гонадами самцов до нереста и сперматозоидами. Во время нереста гонады мидий преимущественно накапливают р- и d-элементы, видимо, из-за способности ионов таких элементов к комплексообразованию и, следовательно, включения в структуру ферментов. Содержание B, Mg, Si, P, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn, As, Se, Br, Sr, Ba в гонадах самцов и самок, половых продуктах и личинках на порядок или несколько порядков выше, чем других элементов. Содержание Ca, Fe, Sr, Sn, I в личинках мидий достоверно выше, чем в гонадах и половых продуктах. Sn – технологический гидрополлютант, поэтому личинки могут служить биоиндикатором загрязнения водной среды этим элементом. Полученные данные представляют практический интерес для совершенствования биотехники воспроизводства морских гидробионтов и получения функциональных продуктов на их основе, что важно для оптимизации менеджмента аквакультуры и для решения проблем, связанных со здоровьем человека.

Ключевые слова: мидия *Mytilus galloprovincialis*, гонады, сперматозоиды, яйцеклетки, личинки, элементы, Черное море

DOI: 10.31857/S086981392303010X, **EDN:** FSZGDZ

В Черном море *M. galloprovincialis* широко культивируется и является одним из доминирующих видов моллюсков. Мидии – фильтраторы, поэтому обладают высокой способностью поглощать элементы из воды [1, 2] и подвергаются воздействию металлов, потребляемых с пищей [3, 4].

Роль элементов обычно выясняют двумя способами: применяя синтетические рационы, составленные из хорошо очищенных компонентов и не содержащие изучаемого элемента, или изучая болезни животных, обусловленные недостатком данного элемента [5]. Предложенные способы трудоемки и не применимы в есте-

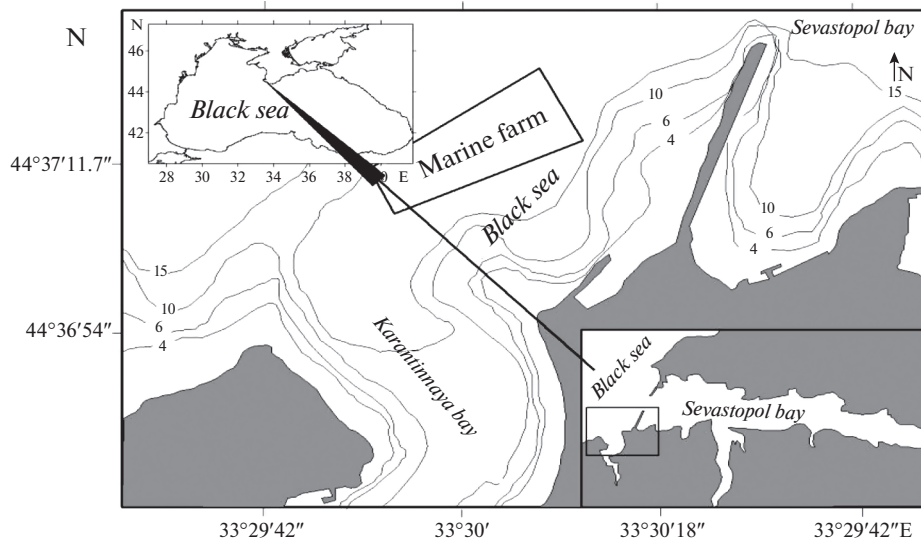


Рис. 1. Карта-схема места отбора проб в Чёрном море.

ственных условиях обитания. Новизна настоящего исследования заключается в изучении элементов, участвующих в размножении мидий, путем сравнения их концентраций, приведенных к единице сухой массы, в биологической системе: “гонады самцов и самок (до и после нереста) → половые продукты → личинки” в период нереста, когда концентрации биологически активных и минеральных веществ максимальны. Оценку элементного состава гонад до и после нереста, половых продуктов и личинок моллюсков еще не проводили, хотя элементный состав тканей и створок мидий хорошо изучен [6], а также описан элементный состав гонад мидий в зависимости от пола и стадии репродуктивного цикла [7]. Известно, что наиболее важным фактором снижения концентрации элементов в тканях является перераспределение элементов по всему организму в процессе интенсивного роста гонад и выведение с половыми продуктами [7]. Кроме того, состояние мидийных популяций в естественной среде обитания напрямую зависит от развития моллюсков на всех стадиях, в т. ч. на начальных стадиях личиночных форм *M. galloprovincialis* широко используется в качестве тест-объекта при биотестировании [8]. Воздействие металлов отражается в первую очередь на потомстве. Изучая элементный состав трохофор мидий, можно оценить состояние всей популяции на исследуемом участке морской акватории.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследований – мидия *Mytilus galloprovincialis* с длиной раковины 7–10 см, а также ее половые продукты и личинки, полученные в лабораторных условиях. Моллюсков отбирали водолазным способом с коллекторов мидийно-устричной фермы в Карантинной бухте г. Севастополя (44°61'83.46" N, 33°50'33.80" E) весной 2019 г. (рис. 1). Глубина отбора проб – 2–3 м, температуре воды – 8°C.

Раковины очищали от обрастаний и биоотложений и промывали чистой фильтрованной морской водой [7]. Выстилающие обе створки гонады отделяли от раковин с помощью пластмассового скальпеля и промокали фильтровальной бумагой.

Половую принадлежность и стадии репродуктивного цикла мидий определяли на свежих мазках гонад с помощью микроскопа [9].

Параметры морской воды, в которой проходил нерест и выращивание личинок: температура – $20 \pm 2^\circ\text{C}$; pH – 7.8–8.3; $[\text{Ca}^{2+}]$ – 210–290 мг/л; $[\text{Mg}^{2+}]$ – 460–640 мг/л; соленость – 18‰; насыщенность воды растворенным кислородом – 100–110%. Помещение, где проходил нерест, не содержало токсичных паров и газов, температура окружающего воздуха – $20 \pm 2^\circ\text{C}$, освещенность (естественное и искусственное освещение) не превышала 750 лк.

Каждого моллюска помещали макушкой вниз в стаканы объемом 0.5 л и заливали профильтрованной через мембранный фильтр (3–5 мкм) морскую воду, нагретую до 26°C , стимулируя тем самым нерест. Через 1–3 ч после стимуляции яйцеклетки осаждались на дно в виде оранжевого осадка, сперма образовывала в воде белое облако. После выделения половых продуктов моллюсков удаляли из стаканов. Воду над осадком яйцеклеток сливали, остаток центрифугировали 5 мин при 1500 об./мин, а взвесь сперматозоидов центрифугировали 10 мин при 1500 об./мин. В результате получали чистый однородный осадок яйцеклеток и сперматозоидов. Гонады и половые продукты от каждой особи высушивали в сушильном шкафу при температуре 105°C .

Оставшиеся растворы с яйцеклетками отфильтровывали от биоотложений, объединяли и переносили в трехлитровую емкость. В отдельную емкость собирали отфильтрованные от биоотложений растворы со спермой. Чтобы исключить полиспермию, к раствору с яйцеклетками добавляли 10 мл раствора со спермой. Личинок мидии выращивали трое суток, пока они находились на эндогенном питании. Биомассу личинок, полученную на третьи сутки эксперимента, отделяли от воды с помощью фильтра с размером пор 84 мкм, промывали деионизированной водой и высушивали до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре 105°C . Высушенные образцы гонад, половых продуктов и личинок просеивали с помощью нейлонового волокнистого сита, отделяя фракцию с размером частиц менее 70 мкм.

Навески высушенных гонад, половых продуктов и личинок массой 100 мкг переносили во фторопластовые пробирки для мокрого сжигания. Добавляли 4 мл химически чистой азотной кислоты (63–65%), дополнительно очищенной в системе очистки кислот DST-1000 (США). Пробирки закрывали фторопластовыми крышками и два часа выдерживали в автоклаве при 120°C . После сжигания растворенные образцы разбавляли деионизированной водой с удельным сопротивлением 18.2 МОм см, полученной в деионизаторе Д-301 (Россия), чтобы разбавление было в пределах 1000–2000 мг г⁻¹ (в пересчете на сухую массу).

Для приготовления стандартных растворов применяли многоэлементный стандарт IV-ICPMS-71A-C (Inorganic Ventures, США, 10 мг л⁻¹). Точность анализа ИСП-МС верифицирована измерениями концентраций элементов в стандартном образце тканей мидии *Mytilus edulis* ERM®-CE278k, Бельгия.

Количественный микроэлементный анализ проводили в ЦКП “Спектрометрия и хроматография” Института биологии южных морей РАН с помощью масс-спектрометра с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС) Plasma Quant MS Elite, номер в ГРСИ РФ: 63680-16, по методике, предложенной ранее [7]. Градуировочные кривые строили по стандартным растворам, полученным путем разбавления деионизированной водой многоэлементного стандарта IV-ICPMS-71A-C (Inorganic Ventures, США, 10 мг л⁻¹). Коэффициенты детерминации R^2 для всех градуировочных графиков составляли не менее 0.998.

Статистические сравнения для каждого элемента осуществляли в среде Матлаб версии 8.2.0. Значимость различий оценивали при $p < 0.05$.

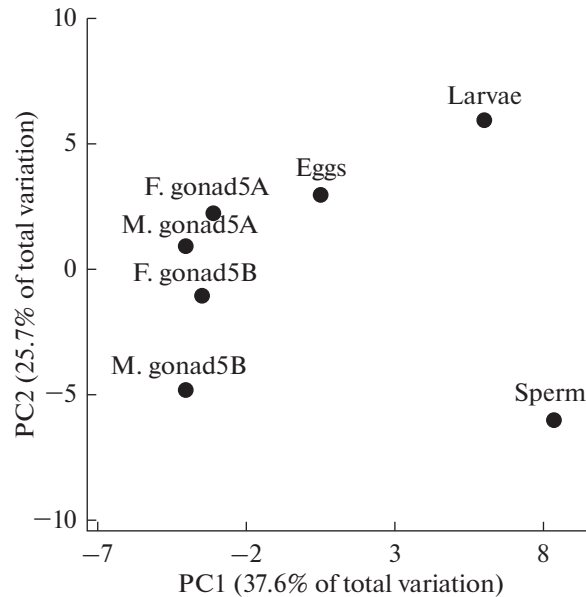


Рис. 2. Расположение полученных данных в проекции на плоскости первых двух главных компонент (метод главных компонент, Principal Component Analysis, PCA).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Статистически различающиеся концентрации элементов в гонадах, половых продуктах и личинках мидии обобщены в табл. 1 и на рис. 2. Элементы, между содержанием которых в гонадах, половых продуктах и личинках не было обнаружено статистически значимых различий, не рассматривали. Не принимали во внимание элементы с большим разбросом полученных значений концентраций в выборке или с очень низким значением концентраций, что могло привести к неточным результатам исследований. Данные в таблицах приведены к единице сухой массы. Согласно применяемым средствам химического анализа, содержание Na в данной работе не определяли, так как морская вода, в которой выращивали личинок, является матрицей для этого элемента.

Самый удобный способ изобразить распределение элементов в гонадах, половых продуктах и личинках при помощи многомерного анализа. Анализ главных компонент, один из вариантов многомерных методов анализа, проводился с помощью программы PRIMER 6. На рис. 2 показана проекция счетов главных компонент данных по элементному составу для каждой ткани на координатную плоскость первых двух главных компонент. Первая главная компонента (PC1) показывает различия между элементным составом гонад самцов и самок до нереста и после нереста с половыми продуктами и личинками – 37.6% общей вариации, а вторая главная компонента (PC2), объясняющая 25.7% общей вариации, – между гонадами самцов и самок до и после нереста, а также между яйцеклетками и личинками со сперматозоидами. В работе Richir и Gobert [10] наблюдались различия между участками мягких тканей мидий до и после нереста.

Элементы во время нереста распределены в гонадах, половых продуктах и личинках неравномерно (табл. 1 и рис. 2). Статистически значимые различия элементного состава гонад самцов и самок до и после нереста, половых продуктов и

Таблица 1. Элементный состав (в мг кг⁻¹ сух. массы) гонад до и после нереста, половых продуктов и личинок мидии *Mytilus galloprovincialis*

Элемент	Яйцеклетки		Личинки		Сперматозоиды		Г ♂♂ 5А		Г ♂♂ 5Б	
	а	б	с	д	е	ф	г	ж	з	и
Li	0.1 ± 0.01 ^{b, d, e, j}	0.2 ± 0.1 ^{a, c, f, j}	0.1 ± 0.02 ^{b, d, e}	0.2 ± 0.01 ^{a, c, e, f, j}	0.2 ± 0.02 ^{a, c, d, f, j}	0.1 ± 0.01 ^{b, d, e}	0.1 ± 0.01 ^{b, d, e}	0.1 ± 0.01 ^{b, d, e}	0.1 ± 0.01 ^{b, d, e}	0.1 ± 0.01 ^{b, d, e}
B	24 ± 8 ^{b, d, e}	75 ± 24 ^{a, c, f, j}	33 ± 14 ^{b, d, e}	67 ± 21 ^{a, c, f, j}	96 ± 16 ^{a, c, f, j}	27 ± 9 ^{a, c, f, j}	27 ± 9 ^{a, c, f, j}	27 ± 9 ^{a, c, f, j}	27 ± 9 ^{a, c, f, j}	27 ± 9 ^{a, c, f, j}
Mg	4518 ± 2432 ^{b, d, e}	18675 ± 7451 ^{a, c, e, f}	5438 ± 3217 ^{b, d, e}	14200 ± 3442 ^{a, c, e, f, j}	22209 ± 3875 ^{a, c, d, f, j}	4426 ± 1338 ^{b, d, e}	4426 ± 1338 ^{b, d, e}	4426 ± 1338 ^{b, d, e}	4426 ± 1338 ^{b, d, e}	4426 ± 1338 ^{b, d, e}
Si	1238 ± 1153 ^e	129 ± 36 ^{c, e, f}	741 ± 298 ^{b, d, e}	215 ± 103 ^c	496 ± 384 ^{a, b, c, e, f, j}	650 ± 103 ^{b, e}	650 ± 103 ^{b, e}	650 ± 103 ^{b, e}	650 ± 103 ^{b, e}	650 ± 103 ^{b, e}
P	6298 ± 1743 ^{d, e, j}	5340 ± 1577 ^{d, e, f, j}	7201 ± 1130 ^{d, e, j}	2294 ± 643 ^{a, b, c, e, f, j}	11802 ± 3274 ^{a, b, c, d, j}	10182 ± 3559 ^{b, d, e}	10182 ± 3559 ^{b, d, e}	10182 ± 3559 ^{b, d, e}	10182 ± 3559 ^{b, d, e}	10182 ± 3559 ^{b, d, e}
K	10764 ± 3363 ^г	13554 ± 3293	13925 ± 1522 ^г	6922 ± 1472 ^г	15182 ± 2523	14816 ± 2304	14816 ± 2304	14816 ± 2304	14816 ± 2304	14816 ± 2304
Ca	13365 ± 7916 ^{d, e}	8145 ± 5172 ^{c, d, e, j}	1919 ± 1106 ^{b, d, e}	168804 ± 112440 ^{a, b, c, e, f, j}	15105 ± 2512 ^{a, b, c, d, j}	16712 ± 11101 ^d	16712 ± 11101 ^d	16712 ± 11101 ^d	16712 ± 11101 ^d	16712 ± 11101 ^d
V	0.3 ± 0.2 ^e	0.7 ± 0.5 ^e	0.4 ± 0.2 ^e	1 ± 0.1 ^e	1 ± 0.9 ^{a, b, c, d, f}	0.3 ± 0.1 ^e	0.3 ± 0.1 ^e	0.3 ± 0.1 ^e	0.3 ± 0.1 ^e	0.3 ± 0.1 ^e
Cr	3 ± 2 ^e	2 ± 0.6 ^e	3 ± 1 ^e	2.3 ± 0.3 ^e	15 ± 9 ^{a, b, c, d, f}	3 ± 1 ^e	3 ± 1 ^e	3 ± 1 ^e	3 ± 1 ^e	3 ± 1 ^e
Mn	11 ± 5 ^{d, f}	11 ± 3 ^{d, f, j}	12 ± 4 ^{d, f, j}	3 ± 0.3 ^{a, b, c}	10 ± 7	3 ± 1 ^{a, b, c}	3 ± 1 ^{a, b, c}	3 ± 1 ^{a, b, c}	3 ± 1 ^{a, b, c}	3 ± 1 ^{a, b, c}
Fe	70 ± 45 ^{d, e}	81 ± 37 ^d	104 ± 63 ^d	432 ± 237 ^{a, b, c, e, f, j}	298 ± 247	95 ± 81 ^d	95 ± 81 ^d	95 ± 81 ^d	95 ± 81 ^d	95 ± 81 ^d
Co	0.04 ± 0.01 ^{c, d}	0.04 ± 0.01 ^{c, d}	0.1 ± 0.02 ^{a, b, d}	0.1 ± 0.02 ^{a, b, c, j}	0.1 ± 0.05	0.04 ± 0.04	0.04 ± 0.04	0.04 ± 0.04	0.04 ± 0.04	0.04 ± 0.04
Ni	1 ± 0.3 ^{d, e}	0.4 ± 0.2 ^{d, e}	0.4 ± 0.3 ^{d, e}	2 ± 1 ^{a, b, c, f, j}	3 ± 2 ^{a, b, c, f, j}	0.3 ± 0.1 ^{d, e}	0.3 ± 0.1 ^{d, e}	0.3 ± 0.1 ^{d, e}	0.3 ± 0.1 ^{d, e}	0.3 ± 0.1 ^{d, e}
Cu	3 ± 2	4 ± 1 ^{f, j}	4 ± 1 ^{f, j}	2 ± 1	4 ± 2 ^f	2 ± 0.2 ^{b, c, e, j}	2 ± 0.2 ^{b, c, e, j}	2 ± 0.2 ^{b, c, e, j}	2 ± 0.2 ^{b, c, e, j}	2 ± 0.2 ^{b, c, e, j}
Zn	56 ± 26 ^{d, e, f, j}	49 ± 12 ^{d, e, f, j}	54 ± 16 ^{d, e, f, j}	25 ± 4 ^{a, b, c}	19 ± 10 ^{a, b, c}	23 ± 7 ^{a, b, c}	23 ± 7 ^{a, b, c}	23 ± 7 ^{a, b, c}	23 ± 7 ^{a, b, c}	23 ± 7 ^{a, b, c}
Ge	0.1 ± 0.0 ^e	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.0 ^e	0.1 ± 0.02 ^{f, j}	0.1 ± 0.01 ^{a, c, f, j}	0.1 ± 0.01 ^{d, e}	0.1 ± 0.01 ^{d, e}	0.1 ± 0.01 ^{d, e}	0.1 ± 0.01 ^{d, e}	0.1 ± 0.01 ^{d, e}
As	40 ± 34 ^г	33 ± 7 ^{c, j}	23 ± 2 ^{b, j}	25 ± 9 ^г	28 ± 5 ^г	18 ± 9	18 ± 9	18 ± 9	18 ± 9	18 ± 9
Se	10 ± 5	15 ± 4	14 ± 3 ^г	9 ± 4	14 ± 3 ^г	11 ± 3	11 ± 3	11 ± 3	11 ± 3	11 ± 3
Br	257 ± 90	158 ± 54 ^{c, f, j}	65 ± 27 ^{b, d, e, j}	165 ± 74 ^{c, f, j}	202 ± 40 ^{c, f, j}	60 ± 17 ^{b, d, e}	60 ± 17 ^{b, d, e}	60 ± 17 ^{b, d, e}	60 ± 17 ^{b, d, e}	60 ± 17 ^{b, d, e}
Rb	3 ± 1 ^г	3 ± 0.8 ^г	4 ± 1 ^{d, e}	2 ± 0.5 ^{c, f, j}	3 ± 1 ^{c, j}	4 ± 1 ^d	4 ± 1 ^d	4 ± 1 ^d	4 ± 1 ^d	4 ± 1 ^d
Sr	92 ± 69 ^{b, d, e}	179 ± 107 ^{a, c, d, f, j}	44 ± 30 ^{c, d, e}	1615 ± 1037 ^{a, b, c, e, f, j}	211 ± 52 ^{a, c, d, f, j}	54 ± 43 ^{b, d, e}	54 ± 43 ^{b, d, e}	54 ± 43 ^{b, d, e}	54 ± 43 ^{b, d, e}	54 ± 43 ^{b, d, e}
Mo	0.04 ± 0.02 ^d	0.3 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0 ^{a, f}	1 ± 0.5	0.1 ± 0.01 ^d	0.1 ± 0.01 ^d	0.1 ± 0.01 ^d	0.1 ± 0.01 ^d	0.1 ± 0.01 ^d
Pd	0.7 ± 0.1 ^г	0.7 ± 0.2	1 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.08	0.7 ± 0.08	0.7 ± 0.08	0.7 ± 0.08	0.7 ± 0.08
Sn	0.8 ± 0.4 ^d	1 ± 0.7 ^{d, f}	0.5 ± 0.2 ^{d, f}	8 ± 5 ^{a, b, c, e, f, j}	1 ± 1 ^{d, f}	0.1 ± 0.1 ^{b, c, d, e}	0.1 ± 0.1 ^{b, c, d, e}	0.1 ± 0.1 ^{b, c, d, e}	0.1 ± 0.1 ^{b, c, d, e}	0.1 ± 0.1 ^{b, c, d, e}
I	0.05 ± 0.05	17 ± 3 ^г	0.02 ± 0.01 ^f	19 ± 5 ^г	27 ± 8 ^{b, c, d, j}	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Ba	6 ± 3	3 ± 3	2 ± 1.5 ^d	3 ± 1.5 ^{c, e, f}	3 ± 1 ^{d, f}	1 ± 0.3 ^{d, e}	1 ± 0.3 ^{d, e}	1 ± 0.3 ^{d, e}	1 ± 0.3 ^{d, e}	1 ± 0.3 ^{d, e}
Ce	0.2 ± 0.1 ^e	0.2 ± 0.1 ^e	0.2 ± 0.2 ^e	0.5 ± 0.4	1 ± 1 ^{a, b, c}	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.2

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение ($p < 0.05$, $n = 15$, где n – количество измерений), разные буквы показывают статистические различия результатов; Г ♀♀ 5А и Г ♂♂ 5А – гонады самок и самцов до нереста на пятой стадии репродуктивного цикла; Г ♀♀ 5Б и Г ♂♂ 5Б – гонады самок и самцов после нереста на пятой стадии репродуктивного цикла.

личинки указывают на непосредственное участие элементов в процессе размножения или в процессах, сопутствующих ему.

Микроэлементы, имеющие низкие атомные номера (от 24 до 33) участвуют в функционировании клеток морских организмов в качестве минорных компонентов белков, углеводов, липидов. В частности, ионы каталитических элементов Cu, Zn, Co и Ni известны как активаторы ферментов – кофакторы [11]. Cu является кофактором многих ферментов, например, супероксиддисмутазы и цитохром *c*-оксидазы [12]. Установлено участие Cu в регуляции активности металлоэнзимов, способствующих ассимиляции Ca и P, что говорит о влиянии Cu на обмен макроэлементов как в гонадах, так и в половых продуктах [13–16]. Воздействие ионов Cu или Zn на сперматозоиды *Mytilus edulis* вызывает снижение их подвижности [17]. Известно, что ионы Cu в большей степени способны подавлять гаметогенез у мидий, чем ионы Zn [18, 19]. При исследовании влияния Cu на ранние стадии жизни мидии *Mytilus trossulus* чувствительность к Cu уменьшалась в ряду: эмбрионы > сперма > яйцеклетки. После воздействия 10 мкг л⁻¹ Cu наблюдали резкое увеличение аномального развития эмбрионов. Подвижность сперматозоидов значительно снижалась при воздействии 100 мкг л⁻¹ Cu из-за снижения митохондриальной активности сперматозоидов. Более низкие концентрации Cu не влияли на жизнедеятельность сперматозоидов. Воздействие Cu (при любой концентрации) не влияло также на жизнедеятельность яйцеклеток [20].

После 24-часового воздействия концентраций Cd (от 0.001 до 1 мг л⁻¹) и Cu (от 0.01 до 10 мг л⁻¹) на яйцеклетки мидии *Perna viridis* процент неоплодотворенных яйцеклеток возрастал по мере увеличения концентраций воздействия: от 5% до 25% – для Cd и от 2.5% до 25% – для Cu. Результаты экспериментов показали, что относительно невысокие концентрации Cu (менее 0.01 мг л⁻¹) и Cd (менее 0.001 мг л⁻¹) не влияли на процесс оплодотворения *Perna viridis* [21].

Биологическая роль Zn связана с функцией ферментов. Цинк является кофактором большой группы ферментов, катализирующих гидролиз пептидов, белков и сложных эфиров, полимеризацию ДНК и РНК в составе ДНК- и РНК-полимераз. Известна специфическая функция цинка в репродуктивной системе амфибий [22].

Меньше всего статистически значимых различий в элементном составе обнаружено между гонадами самок и самцов до нереста, гонадами самок до и после нереста и гонадами самцов до и после нереста. Так, в гонадах самок до нереста концентрации Mn и Zn (11 ± 5 и 56 ± 26 мкг кг⁻¹) статистически выше, чем в гонадах самцов до нереста (3 ± 1 и 23 ± 7 мкг кг⁻¹). По-видимому, в гонадах самок ферментативные процессы, включающие Mn, происходят интенсивнее. Mn широко распространен во всех растениях, поэтому наиболее вероятен путь поступления в Mn организм мидий вместе с микроводорослями. Zn играет существенную функциональную роль в гаметогенезе у самок моллюсков [1, 10]. Видимо, мидии поглощают микроэлементы, в том числе Zn, из окружающей среды с пищей или из загрязненной промышленными отходами воды, где они, подобно стероидным гормонам, депонируются в мягких тканях, а затем экскретируются вместе с половыми продуктами [23–25]. Концентрация Zn в сперматозоидах составляет 19 ± 10 мкг кг⁻¹, а в гонадах самцов до нереста – 23 ± 7 мкг кг⁻¹.

Статистически значимые различия в содержании Cu отмечены между гонадами самцов до и после нереста: 2 ± 0.2 и 3 ± 1 мкг кг⁻¹ соответственно. Более высокая концентрация Cu в гонадах самцов после нереста объясняется уменьшением массы гонад за счет экскреции сперматозоидов. Cu или ее соединения, вероятно, участвуют в регуляции активности сперматозоидов. Известно, что ионы Cu, как и Zn, действуют как кофакторы некоторых ферментов у моллюсков [26].

Гонады самок мидий до и после нереста статистически различаются по содержанию Co: 0.04 ± 0.01 и 0.1 ± 0.02 мг кг⁻¹ соответственно. Ионы биогенного d-элемента Co входят в структуру активных центров ферментов, по-видимому, участвующих в процессе посленерестовой перестройки гонад.

Концентрация Li, B, Mg, K, V, Fe, Cu, Sr, Sn, Se, Mo, I в яйцеклетках статистически выше, чем в гонадах самок до нереста (табл. 1). Mo является частью молибденового ко-фактора молибдопротеина, который входит в состав окислительно-восстановительных ферментов, а также является регулятором активности стероидных рецепторов [16].

Содержание Ca, Fe, Sr, Sn, I в личинках мидий достоверно выше, чем в гонадах и половых продуктах (табл. 1). Ca необходим для формирования оболочек личинок. Концентрация Ca в сперматозоидах мидий выше, чем в яйцеклетках: 15105 ± 2512 и 8145 ± 5172 мг кг⁻¹ соответственно, т. к. яйцеклетки состоят преимущественно из липидов, а не белков [27]. Ca модулирует движение жгутиков сперматозоидов [28].

Недавние исследования группы ученых из Института биологии южных морей показали, что содержание Cd, Cu, As, Hg, Pb, Zn в мягких тканях культивируемых мидий не превышало допустимых уровней [29]. В то же время Sn – технологический гидрополлютант, поэтому личинки могут служить индикатором загрязнения водной среды. Источником Sn в акватории Севастополя могут быть судоремонтные заводы, применяющие паяльные конструкции.

Следует отметить, что у моллюсков существует особый механизм связывания ионов тяжелых металлов, обеспечивающий им выживание в условиях, как природных геохимических аномалий, так и сильного антропогенного загрязнения вод этими токсикантами. Такой механизм обусловлен тем, что в цитоплазме клеток возрастает количество водорастворимых низкомолекулярных белков-металлопротеинов, обладающих высоким сродством к ионам металлов. Металлопротеины синтезируются в организме мидий в ответ на поступление ионов Cd, Zn, Cu и Hg [26].

В сперматозоидах мидий также отмечено повышенное содержание Sr, Mg, Cr, I. При этом Sr – аналог Ca. Во время нереста в гонадах, где происходит интенсивный обмен веществ, ионы магния находятся в комплексе с АТФ [7]. Mg необходим для формирования половых продуктов и может служить источником энергии для обеспечения подвижности сперматозоидов [30].

Причины появления Cr в окружающей среде могут быть как антропогенными, так и естественными. Природный Cr встречается в основном в трехвалентном состоянии. В шестивалентном состоянии Cr является очень токсичным микроэлементом, мутагеном и представляет угрозу прибрежным экосистемам. Cr(VI) в 30 раз токсичнее Cr(III) [31].

Концентрация Ni в сперматозоидах и личинах мидий (3 ± 2 и 2 ± 1 мг кг⁻¹ соответственно) статистически выше, чем в гонадах самок до нереста и яйцеклетках (1 ± 0.3 и 0.4 ± 0.2 мг кг⁻¹ соответственно). Некоторые беспозвоночные продуцируют ферменты, содержащие Ni в активных центрах. Однако в высоких концентрациях Ni токсичен [32]. Известно, что Ni, наряду с Cd и As ингибирует механизмы репарации ДНК [6].

Роль V в моллюсках еще не известна, и гонады мидий, скорее всего, накапливают этот элемент в качестве фактора роста. Так, V способен ускорять рост крыс, содержащихся на высокоочищенном аминокислотном рационе [33].

Следует отметить, что период нереста или сильное загрязнение среды обитания могут вызывать изменения массы тела мидий и, следовательно, изменение концентрации микроэлементов металлов в гонадах, половых продуктах и личинках [34], но в биологической системе “гонады → половые продукты → личинки” будет от-

четливо проследить изменение соотношения эссенциальных элементов и гидрополлютантов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оценивая работу в целом, можно выделить теоретическую и практическую значимость выполненных исследований. Полученные данные демонстрируют, что в период нереста в биологической системе “гонады → половые продукты → личинки” происходит интенсивное перераспределение как биогенных элементов, так и гидрополлютантов. Элементный состав яйцеклеток и личинок мидий отражает состояние всей популяции. Личинки мидий накапливают Ca, Fe, Sr, Sn, I в количествах, превышающих содержание этих элементов в яйцеклетках и сперматозоидах. При этом очевидна эссенциальная роль Ca, Sr или Fe. Sn в Черном море является техногенным гидрополлютантом. Степень загрязнения популяции моллюсков следует оценивать не только мониторингом элементного состава моллюсков во время нереста (два раза в год), а также водной среды, в которой происходит нерест.

Практическая значимость полученных результатов заключается в применении мидий, собранных в период нереста, с целью получения биологически активных веществ, обогащенных макро- и микроэлементами.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях, с участием мидий, соответствовали этическим стандартам и утвержденным правовыми актами РФ, а также принципам Базельской декларации.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках госзадания ФИЦ ИнБЮМ по темам: “Фундаментальные исследования популяционной биологии морских животных, их морфологического и генетического разнообразия” № 121040500247-0 и “Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса” № 121030300149-0.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы (Л.Л.К., В.И.Р.), планирование эксперимента, подготовка и обработка проб, сбор данных (Л.Л.К., С.В.К.), обработка данных (Л.Л.К., С.В.К.), написание и редактирование манускрипта (Л.Л.К., В.И.Р.).

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы благодарят сотрудника Отдела аквакультуры и морской фармакологии Института биологии южных морей к. г. н., с. н. с. М.А. Попова за предоставленный рисунок карты района исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kapranova LL, Ryabushko VI, Kapranov SV, Lishaev VN, Nekhoroshev MV* (2021) Elemental composition of gonads, gametes and larvae in black and brown morphs of the Bivalve Mollusk

- Mytilus galloprovincialis* LAM. J Evol Biochem Physiol 57(6): 1290–1299.
<https://doi.org/10.1134/S0022093021060090>
2. Wang W-X (2002) Interactions of trace metals and different marine food chains. Marine Ecol Progr Series 243: 295–309.
<https://doi.org/10.3354/meps243295>
 3. Ezgeta-Balic D, Najdek M, Peharda M, Blazina M (2012) Seasonal fatty acid profile analysis to trace origin of food sources of four commercially important bivalves. Aquaculture 334–337: 89–100.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.12.041>
 4. Ndiaye B, Ndiaye M, Cid B, Diop A, Diagne I, Cisse D, Dione C, Hanne M (2020) Trace metals in Mussels *Mytilus galloprovincialis* from Dakar Coast (Senegal). Am J Analyt Chem 11(3): 137–145.
<https://doi.org/10.4236/ajac.2020.113011>
 5. Крепс ЕМ (ред) (1982) Физиология животных. Приспособление и среда. М. Мир [Krebs EM (red) (1982) Animal physiology. Adaptation and environment. M. Mir. (In Russ)].
 6. Newton TJ (1995) A review of the effects of heavy metals on freshwater mussels. Ecotoxicology 4(6): 341–362.
<https://doi.org/10.1007/BF00118870>
 7. Kapranov SV, Karavantseva NV, Bobko NI, Ryabushko VI, Kapranova LL (2021) Sex- and sexual maturation-related aspects of the element accumulation in soft tissues of the bivalve *Mytilus galloprovincialis* Lam. collected off coasts of Sevastopol (southwestern Crimea, Black Sea). Environment Sci Pollut Res 28(17): 21553–21576.
<https://doi.org/10.1007/s11356-020-12024-z>
 8. Gupta SK, Singh J (2011) Evaluation of mollusc as sensitive indicator of heavy metal pollution in aquatic system: a review. ИОАВ J 2(1): 49–57.
 9. Nikonova LL, Nekhoroshev MV, Ryabushko VI (2017) Total testosterone and estradiol in the gonads and gametes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. J Evol Biochem Physiol 53(6): 519–522.
<https://doi.org/10.1134/S0022093017060114>
 10. Richir J, Gobert S (2014) The effect of size, weight, body compartment, sex and reproductive status on the bioaccumulation of 19 trace elements in rope-grown *Mytilus galloprovincialis*. Ecol Indic 36: 33–47.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.06.021>
 11. Horne BA (1969) Marine Chemistry: The structure of water and the chemistry of the hydro-sphere. Wiley. New York.
<https://doi.org/10.1007/s10311-011-0343-1>
 12. Castruita M, Casero D, Karpowicz SJ, Kropat J, Vieler A, Hsieh SI, Yan W, Cokus S, Loo JA, Benning C, Pellegrini M, Merchant SS (2011) Systems biology approach in *Chlamydomonas* reveals connections between copper nutrition and multiple metabolic steps. Plant Cell 23: 1273–1292.
<https://doi.org/10.1105/tpc.111.084400>
 13. Andrés-Colás N, Sancenón V, Rodríguez-Navarro S, Mayo S, Thiele DJ, Ecker JR, Puig S, Peñarubia L (2006) The Arabidopsis heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. Plant J 45: 225–236.
<https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2005.02601.X>
 14. Burkhead JL, Reynolds KA, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Pilon M (2009) Copper homeostasis. New Phytologist 182: 799–816.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02846.x>
 15. Page MD, Kropat J, Hamel PP, Merchant S (2009) Two Chlamydomonas CTR Copper Transporters with a Novel Cys-Met Motif Are Localized to the Plasma Membrane and Function in Copper Assimilation. Plant Cell 21: 928–943.
<https://doi.org/10.1105/tpc.108.064907>
 16. Wang D, Simons SS Jr (2005) Corepressor binding to progesterone and glucocorticoid receptors involves the activation function-1 domain and is inhibited by molybdate. Mol Endocrinol 19(6): 1483–1500.
<https://doi.org/10.1210/me.2005-0012>
 17. Earnshaw MJ, Wilson S, Akberali HB, Marriott KRM (1986) The action of heavy metals on the gametes of the marine mussel, *Mytilus edulis* (L.) – III. The effect of applied copper and zinc on sperm motility in relation to ultrastructural damage and intracellular metal localization. Marine Environment Res 20(4): 261–278.
[https://doi.org/10.1016/0141-1136\(86\)90052-8](https://doi.org/10.1016/0141-1136(86)90052-8)
 18. Akberali HB, Earnshaw MJ, Marriott KRM (1984) The action of heavy metals on the gametes of the marine mussel, *Mytilus edulis* (L.) – I. Copper-induced uncoupling of respiration in the un-

- fertilized egg. *Compar Biochem Physiol* 77C(2): 289–294.
[https://doi.org/10.1016/0742-8413\(84\)90015-x](https://doi.org/10.1016/0742-8413(84)90015-x)
19. Akberali HB, Earnshaw MJ, Marriott KRM (1985) The action of heavy metals on the gametes of the marine mussel, *Mytilus edulis* (L.) – II. Uptake of copper and zinc and their effect on respiration in the sperm and unfertilized egg. *Marine Environment Res* 16(1): 37–59.
[https://doi.org/10.1016/0141-1136\(85\)90019-4](https://doi.org/10.1016/0141-1136(85)90019-4)
 20. Fitzpatrick JL, Nadella S, Bucking C, Balshine S, Wood CM (2008) The relative sensitivity of sperm, eggs and embryos to copper in the blue mussel (*Mytilus trossulus*). *Compar Biochem Physiol* 147(4): 441–449.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.01.012>
 21. Chan GSL, Tan LYY (2013) Development of a toxicity bioassay using fertilisation in the green mussel, *Perna viridis*, from exposure to copper and cadmium. *Asian Youth J Biol* 1: 1–12.
 22. Seeler JF, Ajay S, Zaluzec NJ, Bleher R, Lai B, Schultz EG, Hoffman BM, LaBonne C, Woodruff TK, O'Halloran TV (2021) Metal ion fluxes controlling amphibian fertilization. *Nature Chem* 13: 683–691.
<https://doi.org/10.1038/s41557-021-00705-2>
 23. Ahsan U, Kamran Z, Raza I, Ahmad S, Babar W, Riaz MH, Iqbal Z (2014) Role of selenium in male reproduction – a review. *Animal Reprod Sci* 146(1–2): 55–62.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.01.009>
 24. Bezuidenhout J, Dames N, Botha A, Frontasyeva MV, Goryainova ZI, Pavlov D (2015) Trace elements in mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis* from the South African West coast. *Ecol Chem Engineer Soc* 22(4): 489–498.
<https://doi.org/10.1515/eces-2015-0028>
 25. Liu F, Wang W-X (2015) Linking trace element variations with macronutrients and major cations in marine mussels *Mytilus edulis* and *Perna viridis*. *Environment Toxicol Chem* 34(9): 2041–2050.
<https://doi.org/10.1002/etc.3027>
 26. Христофорова НК (ред) (1994) Тяжелые металлы в промысловых и культивируемых моллюсках залива Петра Великого. Владивосток. Дальнаука. [Khristoforova NK (red) (1994) heavy metals in commercial and cultivated mollusks in the Peter the Great Bay. Vladivostok. Dal-nauka. (In Russ)].
 27. Kapranova LL, Nekhoroshev MV, Malakhova LV, Ryabushko VI, Kapranov SV, Kuznetsova TV (2019) Fatty acid composition of gonads and gametes in the Black Sea Bivalve Mollusk *Mytilus galloprovincialis* Lam. at different stages of sexual maturation. *J Evol Biochem Physiol* 55(6): 448–455.
<https://doi.org/10.1134/S0022093019060024>
 28. Ho HC, Suarez SS (2003) Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol Reprod* 68: 1590–1596.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.011320>
 29. Chelyadina NS, Kapranov SV, Popov MA, Smirnova LL, Bobko NI (2022) Trace elements in the detoxifying and accumulating body parts of *Mytilus galloprovincialis* Lamark, 1819 (Crimea, Black Sea): human health risks and effect of the sampling site location. *Environment Sci Pollut Res* 29(40): 61352–61369.
<https://doi.org/10.1007/s11356-022-20186-1>
 30. Amelar RD, Dubin L, Schoenfeld CY (1980) Sperm motility. *Fertility and Sterility* 34(3): 197–215.
[https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)44949-6](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)44949-6)
 31. Guillermo SN, Ammassari LL, Néstor G, Basso NG, Ronco AE (2006) Acute and chronic effects of Cr(VI) on *Hypsiboas pulchellus* embryos and tadpoles. *PubMed* 72(3): 61–67.
<https://doi.org/10.3354/dao072261>
 32. Chalkiadakis O, Paraskevopoulou V, Roussos I, Dassenakis M, Simantiris LN (2013) Comparative study of the accumulation of Ni in different tissues of mussels and soft clams. *E3S Web Conf* 1: 11003.
<https://doi.org/10.1051/e3sconf/20130111003>
 33. Shwarz K, Milne DB (1971) Growth effects of vanadium in the rat. *Science* 174: 426–428.
 34. Kumar V, Sinha AK, Rodrigues PP, Mubiana VK, Blust R, De Boeck G (2015) Linking environmental heavy metal concentrations and salinity gradients with metal accumulation and their effects: a case study in 3 mussel species of Vitoria estuary and Espirito Santo bay, Southeast Brazil. *Sci Total Environment* 523: 1–15.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.139>

Analysis of the Elemental Composition of Gonads, Gametes and Larvae of the Mussel *Mytilus galloprovincialis* in the Spawning Period

L. L. Kapranova^{a, *}, V. I. Ryabushko^a, and S. V. Kapranov^a

^a*Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russia*

**e-mail: lar_sa1980@mail.ru*

In this work, we studied the elemental composition of gonads, eggs, sperm and larvae of the mussel *Mytilus galloprovincialis* during spawning, when the contents of biologically active compounds and minerals are maximal. A comparative analysis of the contents showed that the elements are involved in the mussel gametogenesis in different pathways. There were significant differences in the contents of Li, B, Mg, Si, P, K, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Zn, Ge, As, Se, Br, Rb, Sr, Mo, Pd, Sn, I, Ba and Ce in male and female gonads before and after spawning, gametes and larvae of mussels. It is likely that some of the listed elements are not only passively accumulated in the mollusk body, but are also essential, being directly involved in the reproduction process. Most of significant differences in the element contents were found between eggs and larvae and between male gonads before spawning and sperm. By spawning, mussel gonads accumulated mainly p- and d-elements, apparently due to the ability of their ions to form complexes and, consequently, to be included in the structure of enzymes. The contents of B, Mg, Si, P, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn, As, Se, Br, Sr and Ba in male and female gonads, gametes and larvae were an order or several orders of magnitude higher than those of other elements. The contents of Ca, Fe, Sr, Sn and I in mussel larvae were significantly higher than in gonads and gametes. Sn is a technological hydropollutant, and thus, larvae can serve as a bioindicator of the aquatic environment pollution with this element. The data obtained are of practical interest for improving the biotechnology of reproduction of marine hydrobionts and obtaining functional products based on them, which is important for the optimization of aquaculture management and for addressing human health-related issues.

Keywords: mussel *Mytilus galloprovincialis*, gonads, sperm, eggs, larvae, elements, Black Sea