

МЕТОДИКА ОТБОРА ПОЛОВЫХ ПРОДУКТОВ МИДИИ *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* LAM

*Н.В. Караванцева, Н.В. Поспелова,
Н.И. Бобко, М.В. Нехорошев*

Институт биологии южных морей
НАН Украины
г. Севастополь, пр. Нахимова, 2
E-mail: nkaravan@rambler.ru

Приведена методика сбора половых продуктов черноморских мидий, позволяющая получать суспензии сперматозоидов и яйцеклеток для биохимических и физиологических исследований. В качестве примера применения методики, представлены результаты исследований биохимических (каротиноиды, липиды) и химических (металлы Zn, Cu) показателей в половых клетках моллюсков, культивируемых в прибрежной зоне Крыма (Черное море).

Введение. Экономическая и экологическая эффективность работы морских ферм зависит от плодовитости выращиваемых моллюсков и качества посадочного материала. Успешность размножения культивируемых мидий обеспечивается не только количеством, но и качеством половых продуктов (ПП), которое может быть оценено по морфологическим, биохимическим и физиологическим показателям сперматозоидов и яйцеклеток [1, 2]. Однако, решение этой задачи осложняется трудностью сбора необходимого материала. Поэтому целью нашей работы было разработать методику отбора проб ПП мидии, включающую в себя количественный отбор яйцеклеток и сперматозоидов мидий, отделение суспензии клеток от морской воды и биоотложений, контроль качества отобранного материала.

Материалы и методы. Отбор проб мидий проводили в период с 2009 по 2011 гг. Моллюсков с длиной раковины $6,7 \pm 0,4$ см, возрастом 1,5 – 2 года (со времени установки экспериментального коллектора), отбирали с фермы, расположенной в б. Ласпи (40 км восточнее Севастополя), с глубины 2 м. Нерест моллюсков вызывали по методике температурной стимуляции нереста [3]. Пол и стадию зрелости гонад

моллюсков определяли по 6-ти бальной шкале на мазке гонад с помощью микроскопа МБИ-6 [4]. Концентрацию каротиноидов в половых продуктах определяли по [5], сухую массу ПП и липидов в них – по [6]. Количественное содержание ионов металлов определяли с помощью пламенной атомно-адсорбционной спектрофотометрии на приборе С-115. Всего проанализировано 109 моллюсков и обработано 218 проб.

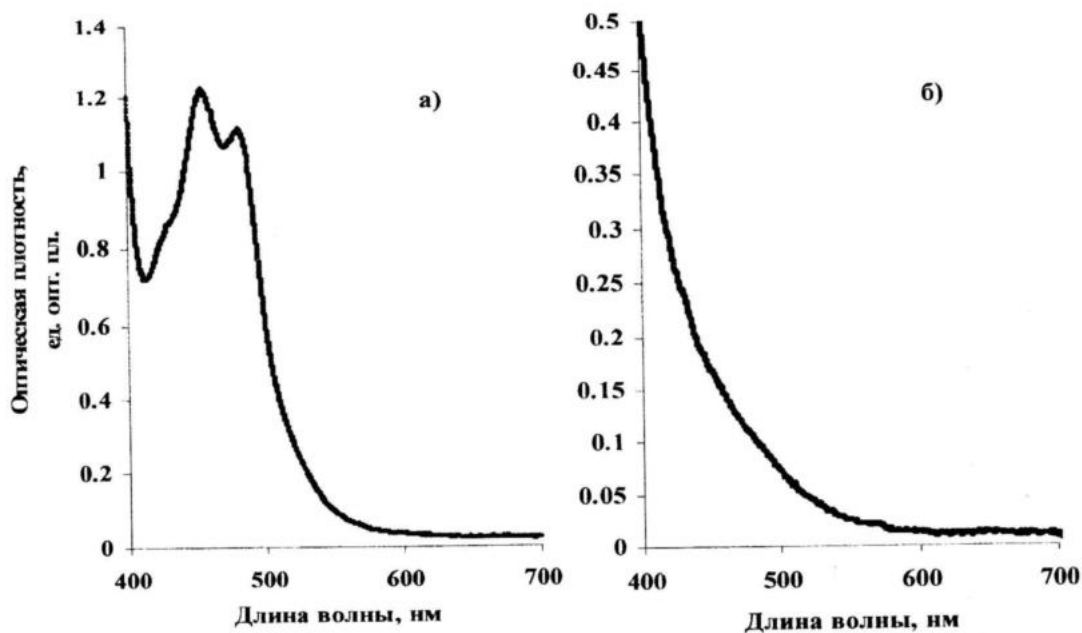
Описание методики. Створки мидий очищали от оброста и тщательно промывали фильтрованной морской водой. Воду фильтровали через ядерные (трековые) мембраны с диаметром пор 1 мкм. Для освобождения желудков мидий от содержимого, моллюсков выдерживали в профильтрованной морской воде в течение 12 часов (с полной сменой воды через 6 часов). Для предотвращения преждевременного нереста температуру воды поддерживали на уровне температуры воды в акватории на момент взятия проб. В весенне – зимний период температура морской воды, в среднем, составляла 10 – 12 °С, в осенний – 20 °С. При этом, во время осеннего нереста, моллюсков, после освобождения желудков от содержимого, помещали на 2 часа в холодильник при температуре от 5 до 7 °С. Для стимуляции нереста мидий рассаживали по 1 экз. в пластмассовые стаканы емкостью 0,5 л с фильтрованной водой температурой от 18 до 20 °С, поддерживая выбранную температуру в течение эксперимента. До начала нереста воду в стаканах регулярно меняли по мере выделения фекалий (2-3 раза). Во время нереста биоотложения удаляли из сосудов при помощи дозатора (на 5 мл, Labsystems, Финляндия). У самцов начало нереста, как правило, отмечалось через 15 мин. от момента стимуляции, у самок – через 20 – 30 мин. Общая продолжительность нереста в условиях эксперимента составляла в среднем 4 – 6 часов. Выметанные яйцеклетки сразу оседали на дно, образуя желто-оранжевый осадок, подвижные сперматозоиды оставались во взвешенном состоянии, образуя суспензию бело-кремового цвета. В пробах также встречались

гермафродитные особи, доля которых, по литературным данным, может составлять до 3% [7, 8]. Чтобы исключить попадание в пробы гермафродитных особей, осуществляли контроль однородности полученных проб на мазке суспензии ПП под микроскопом. По окончании эксперимента мидий извлекали из стаканов.

Задачей следующего этапа являлось максимальное осаждение половых клеток и очищение полученных осадков от морской воды и биоотложений. Для этого использовали многократное центрифугирование с оптимальной скоростью 3000 – 3500 об./мин., при которой половые клетки хорошо концентрируются, оболочка клеток не разрушается и содержимое не переходит в раствор. Так как яйцеклетки оседают на дно в процессе нереста, по окончании эксперимента воду над осадком сливали, половые клетки собирали в пробирки и центрифугировали. Поскольку сперматозоиды довольно подвижные (по нашим наблюдениям активность сохраняется в течении 2-х суток) и практически не оседают на дно сосуда, всю суспензию, полученную за время нереста, центрифугировали 2-3 раза по 10 минут на центрифуге MPW-340 (Польша) до получения прозрачного раствора над осадком. Надосадочную жидкость удаляли, осадок растворяли в небольшом количестве фильтрованной морской воды и переносили в другие пробирки, оставляя на дне 0,1 – 0,2 мл пробы, содержащей посторонние примеси. При центрифугировании на дно пробирки вместе с половыми клетками оседают примеси биоотложений моллюсков. Для получения чистой пробы ПП суспензию клеток 4 раза переносили в чистые пробирки, оставляя на дне 0,05 – 0,1 мл пробы, содержащей примеси, и вновь центрифугировали на центрифуге ОПН-ЗУХЛ4.2 при 3000 об./мин. На заключительном этапе воду над осадком ПП максимально удаляли при помощи дозатора на 1 мл (Labsystems, Финляндия). Описанную процедуру проводили индивидуально для каждого экземпляра мидий. В результате получали чистый однородный осадок сперматозоидов и яйцеклеток. Известно,

что биоотложения мидий содержат значительные концентрации хлорофиллов [9], поглощающие в видимой области при длинах волн $\lambda = 440\text{--}470$ нм и $\lambda = 680$ нм. Пик поглощения хлорофилла при $\lambda = 440\text{--}470$ нм частично перекрывается с пиками поглощения каротиноидов [5]. Поэтому контроль качества отделения ПП от примесей проводили на спектрофотометре СФ - 2000, для чего от каждой пробы отбирали аликвоту (0,5 мл) суспензии ПП и экстрагировали смесью Фолча (метиловый спирт : хлороформ – 1 : 1). Из хлороформ-метанольных экстрактов пигменты переводили в хлороформ (осч) путем добавления дистиллированной воды (1 : 3). Хлороформенную фазу промывали водой 2-3 раза и далее анализировали на спектрофотометре в диапазоне длин волн $\lambda = 350\text{--}700$ нм с шагом 0,1 нм [5]. Как видно из рис. 1 а, б, максимумы спектра поглощения, характерные для хлорофиллов при $\lambda = 670$ нм, отсутствуют, что свидетельствует о качестве полученного материала.

В дальнейшем мы проводили исследование количественного содержания и качественного состава каротиноидов в яйцеклетках и сперматозоидах, поэтому на рис. 1 можно видеть пики в области $\lambda = 450\text{--}480$ нм, характерные для каротиноидных пигментов. На спектрах поглощения экстрактов яйцеклеток отмечено 2 пика при $\lambda = 450$ нм и 480 нм (рис. 1, а). Согласно литературным данным, сперматозоиды не содержат каротиноидов [9]. Однако, при спектральном анализе экстрактов сперматозоидов отмечено поглощение в диапазоне менее 300 нм с перекрыванием области 450 нм (рис. 1, б), что характерно для продуктов разложения каротиноидных пигментов (рис. 1, б). Продукты разложения каротиноидов были обнаружены ранее в макрофитах и микроводорослях [10]. По своей структуре они представляют фрагменты каротиноидов, содержащие основные структурные концевые группы (апокаротиноиды), которые окрашены в цвета от желтого до красно-оранжевого, но не являются истинными каротиноидами, так как у них отсутствует длинноцепочечная цепь сопряженных двойных



Р и с. 1. Спектры поглощения каротиноидов в половых продуктах мидий: а) яйцеклетки, б) сперматозоиды

связей [10]. Можно предположить, что слабоокрашенные экстракты сперматозоидов содержат такие фрагменты. Поэтому расчеты концентрации каротиноидов в сперматозоидах приводили исходя из максимума поглощения 450 нм.

Результаты и обсуждение. При получении суспензии половых клеток, сухая масса ПП полученных от одной особи может достигать у самцов 70 мг, у самок – 360 мг. Описанная методика была апробирована при выполнении исследований биохимического и химического состава сперматозоидов и яйцеклеток мидий. Проведены измерения содержания металлов (Zn, Cu),

каротиноидов и липидов в половых клетках мидий. В качестве примера, в табл. 1 приведены данные, полученные в апреле 2010 и 2011 гг.

Показано, что самки и самцы *M. galloprovincialis* отличаются по содержанию металлов – меди и цинка – в половых продуктах (табл. 1). Концентрация металлов в яйцеклетках выше, чем в сперматозоидах. Так, в весенний период содержание Zn в яйцеклетках в 3,8 раза выше, чем в сперматозоидах и составило 115 мкг/г. Концентрация Cu в ПП самок составила 19 мкг/г, что в 3 раза выше, чем у самцов [11].

Таблица 1

Биохимический и химический состав сперматозоидов и яйцеклеток мидий *M. galloprovincialis* (апрель 2010 и 2011 гг.)

Показатель	Самцы, $\bar{x} \pm \Delta x$	Самки, $\bar{x} \pm \Delta x$
Zn, мкг/г	30,4 ± 6,4	115,4 ± 24,2
Cu, мкг/г	18,7 ± 6,5	21,8 ± 6,8
Концентрация каротиноидов, мг/100 г сухой массы	0,5 ± 0,3	4,9 ± 1,5
Концентрация липидов, % от сухой массы	3,7 ± 1,9	11,4 ± 2,6
Сухая масса ПП, мг/особь	197,9 ± 157,0	360,2 ± 121,4

По содержанию липидов и каротиноидов в ПП в период массового весеннего нереста мидий отмечена та же тенденция. Концентрация липидов в яйцеклетках была в 3 раза выше, чем в сперматозоидах (11,4% от сухой массы) (табл. 1), тогда как зимой доля липидов в составе ПП не зависела от пола и составила, в среднем, 7% от сухой массы [12]. К классу липидов относятся и каротиноиды. Как было указано выше, сперматозоиды, в отличие от яйцеклеток, не содержат истинных каротиноидных пигментов, а только следы продуктов их разложения (до 0,5 мг/100 г сухой массы). Содержание каротиноидов в яйцеклетках сопоставимо с содержанием этих пигментов в тканях гонад и составило от 5 до 20 мг/100 г сухой массы в зависимости от сезона [12] (табл. 1).

Заключение. Впервые разработана методика, позволяющая получать чистые суспензии сперматозоидов и яйцеклеток черноморских мидий. Половые клетки, полученные с помощью этой методики, могут быть использованы для морфологических, физиологических и биохимических исследований, а также при анализе качества половых продуктов, что важно для эффективности функционирования морских ферм и питомников. Исследования по содержанию биологически активных веществ и микроэлементов в половых продуктах позволят оценить роль этих соединений в процессе размножения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пиркова А.В. Размножение мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. и элементы биотехнологии ее культивирования : автореф. дисс. на соискание учен. степени канд. биол. наук : спец. 03.00.18 «Гидробиология» / А.В. Пиркова. – Севастополь, 1994. – 25 с.
2. Cosson J., Groison A.-L., Suquet M. et al. Studying sperm motility in marine fish: an overview on the state of the art // J. Appl. Ichthyol. – 2008. – No 24. – P. 460 – 486.
3. Newel R., Thompson R. Reduced clearance rates associated with spawning in the mussel, *Mytilus edulis* (L) (Bivalvia, Mytilidae) / R. Newel, R. Thompson // Mar. Biol. Lett. – 1984. – Vol. 5, №1. – P. 21 – 23.
4. Пиркова А.В., Столбова Н.Т., Ладыгина Л.В. Сезонная динамика нереста мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. в иловых поселениях разных районах Чёрного моря // Гидробиол. журн. – 1994. – 30, № 2. – С. 22 – 27.
5. Карнаухов В.Н. Биологические свойства каротиноидов / В.Н. Карнаухов. – М. : Наука, 1988. – 240 с.
6. Филиппович Ю.Б. Практикум по общей биохимии / Ю.Б. Филиппович, Т.А. Егорова, Г.А. Севастьянова / под ред. Ю.Б. Филипповича – М. : «Просвещение», 1975. – 318 с.
7. Иванов В.Н., Холодов В.И., Сеничева М.И., Пиркова А.В., Булатов К.В. Биология культивируемых мидий – Киев: Наукова думка, 1989. – 100 с.
8. Караванцева Н.В. Половая структура мидий *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) обитающих у берегов Крыма // Экология моря. – 2009. – Вып. 77. – С. 57– 61.
9. Scheer B.T. Some features of the metabolism of the carotenoid pigments in the California sea mussel (*Mytilus californianus*) / B.T. Scheer // J. Biol. Chem. – 1940. – Vol. 136, № 3. – P. 275 – 299.
10. Mori K., Ooi T., Hiraoka M., Oka N., Hamada H., Tamura M., Kusumi T. Fucoxanthin and Its Metabolites in Edible Brown Algae Cultivated in Deep Seawater / K. Mori // Marine Drugs. – 2004. – 2. - P. 63 – 72.
11. Караванцева Н.В. Содержание меди и цинка в половых продуктах и гонадах мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Биоразнообразие и устойчивое развитие: Тез. докл. II Междунар. науч. – практ. конф. (Симферополь, 12 – 16 сентября 2012 г.). – Симферополь, 2012. – С. 367 – 369.
12. Иванов В.Н., Караванцева Н.В., Нехорошев М.В. Содержание липидов и каротиноидов в выметанных половых продуктах черноморской *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Мор. экол. журн. – 2009. – Т. 4, №1. – С. 84.