

# ВЛИЯНИЕ СОЛЁНОСТИ НА АКТИВНОСТЬ ОКСИДОРЕДУКТАЗ В ТКАНЯХ МОЛЛЮСКА-ВСЕЛЕНЦА В ЧЁРНОЕ МОРЕ *ANADARA KAGOSHIMENSIS* (TOKUNAGA, 1906)

© 2023 Головина И.В.

ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН», Севастополь, 299011, Россия  
e-mail: ivgolovina@mail.ru

Поступила в редакцию 26.05.2022. После доработки 28.04.2023. Принята к публикации 18.05.2022

Изучали влияние солёности на активность ферментов энергетического обмена и антиоксидантной защиты: малатдегидрогеназы (МДГ, 1.1.1.37), лактатдегидрогеназы (ЛДГ, 1.1.1.27) и каталазы (1.11.1.6) в тканях анадары. Четыре группы взрослых моллюсков (длина раковины 37.0–55.5 мм) в течение двух суток подвергли экспозиции к различной солёности (15‰, 25‰, 35‰ и 45‰) при температуре воды 21 °С и постоянной аэрации (6.5±0.3 мг О<sub>2</sub>/л). Активность МДГ достигала максимальной величины в ткани ноги и гепатопанкреаса анадары при нативной для вселенца солёности 35‰, достоверно превысив свои значения в условиях 15 и 25‰ в 1.7 раза ( $p < 0.05$ ) в обеих тканях; в жабрах активность фермента сохранялась на стабильном уровне. Обнаружена тенденция к увеличению активности ЛДГ в ноге и жабрах на 24–48% в условиях солёности 25–35‰ на фоне крайне низкой активности фермента в гепатопанкреасе во всех опытах. Установлена отрицательная корреляция ( $r$ ) в ноге и жабрах между индексом МДГ/ЛДГ и активностью ЛДГ (от  $-0.66$  до  $-0.82$ ,  $p < 0.05$ ). Максимальная активность каталазы в ноге, жабрах и гепатопанкреасе отмечена в интервале солёности 25–35‰. В жабрах выявлена значительная корреляция активности каталазы и ЛДГ при 25‰ ( $r = 0.72$ ,  $p < 0.05$ ) и 35‰ ( $r = 0.96$ ,  $p < 0.05$ ), а также активности каталазы и МДГ ( $r = 0.71–0.89$ ,  $p < 0.05$ ) во всем исследованном диапазоне солёности. Синхронное снижение активности оксидоредуктаз за пределами оптимальной солёности для анадары (25–35‰) может быть одной из причин замедления роста моллюсков в водоёмах, где солёность не оптимальна.

**Ключевые слова:** Bivalvia, Arcidae, вид-вселенец, солёностная толерантность, метаболические маркеры, Чёрное море.

DOI: 10.35885/1996-1499-16-2-40-50

## Введение

Двустворчатый моллюск *Anadara kagoshimensis* – индо-тихоокеанский вселенец, проник в Чёрное море немногим более полувека назад, впервые обнаружен в акватории Кавказского побережья в 1968 г. [Киселёва, 1992]. Экзотический вид имеет сложную таксономическую историю: первоначально на основании морфологических характеристик был идентифицирован как *Cunearca cornea*/*Scapharca cornea* (Reeve, 1844), затем как *Anadara inaequalis* (Bruguiere, 1789), но с помощью генетических маркеров было показано, что вселившаяся анадара соответствует таксону *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) [Krapal et al., 2014; Strafella et al., 2017]. Чужеродный вид образовал в Азово-Черноморском бассейне устойчивые поселения и успешно конкурирует с аборигенными

*Bivalvia* благодаря комплексу поведенческих, физиологических и биохимических реакций, позволяющих выживать в условиях пониженной солёности, антропогенного загрязнения, воздействия гипоксии и сероводорода [Анистратенко, Халиман, 2006; Soldatov et al., 2010; Golovina et al., 2016; Головина, 2019; Zhivoglyadova et al., 2021].

Естественный ареал анадары охватывает широкий диапазон солёности: от океанической (32–35‰) до слабосолёной воды Азовского моря (10–14‰). Моллюск успешно интегрируется в сообщества макрозообентоса морских лагун с неустойчивым гидрологическим режимом, где солёность значительно варьирует [Rinaldi, 1985; Acarli et al., 2012; Kolyuchkina et al., 2019]. Время выживания *A. kagoshimensis* (= *Scapharca inaequalis*) при солёности 7–9‰ составляет примерно

две недели [Suzuki et al., 2012]. Её способность существовать при различной солёности, эвригалинность, зависит от разнообразных адаптаций и продолжает изучаться для целей экологического мониторинга, а также марикультуры, поскольку кровьсодержащие моллюски сем. Arcidae обладают высокой питательной ценностью и обилием биоактивных веществ [Suzuki et al., 2012; Wang et al., 2017]. На протяжении года исследованы рост и выживаемость молоди *A. kagoshimensis* (= *A. inaequalvis*), выращенной в подвесных сетях в лагуне Суфа (Измир, Турция) в условиях естественного сезонного изменения солёности (от 33.4 до 43.8‰) и температуры (от 8–9 до 31 °С) [Acarli et al., 2012], при этом выживаемость моллюска достигала 65–100%, хотя рост происходил довольно медленно. Определены иммунные параметры (фагоцитарная активность лимфоцитов крови, содержание активных форм кислорода, активность лизоцимов и кислых фосфатаз, общее количество лимфоцитов крови), а также изменчивость генов, связанных с осмотической регуляцией, у *A. kagoshimensis* в условиях различной солёности и при внезапном понижении солёности, которое имитировало приток пресной воды после ливня на побережье Китая [Zhang et al., 2019]. При помощи методов проточной цитометрии и световой микроскопии исследовано влияние экспериментальной гипоосмотической нагрузки на морфофункциональные показатели гемоцитов черноморской *A. kagoshimensis* [Kladchenko et al., 2021].

Метаболические аспекты адаптации анадарты к широкому диапазону солёности до настоящего времени освещены не в полной мере. Представляет интерес установление биохимической стратегии поддержания энергетического обмена в тканях *A. kagoshimensis* при колебаниях солёности морской воды, что может приводить к дополнительным энергетическим затратам и/или снижению аэробной активности моллюсков [Berger, Kharazova, 1997; Sokolova et al., 2012; Carregosa et al., 2014]. Неспецифические ферментные биомаркеры – малатдегидрогеназа (МДГ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ) и каталаза используются в процессе изучения физиолого-биохимиче-

ских реакций моллюсков на гипоксию/аноксию, сероводородное заражение, изменение температуры и солёности, подкисление и загрязнение морской воды [Горомосова, Шапиро, 1984; Paganini et al., 2010; Golovina et al., 2016; Somero et al., 2017; Dong et al., 2018; Yusseppone et al., 2018; Головина, 2019; Haider et al., 2019; Sokołowski et al., 2021]. Ферменты дегидрогеназы, особенно ЛДГ и цитоплазматическая МДГ, являются удобной экспериментальной системой для исследователей [Somero, 2010; Bishop, Iliffe, 2012; Yancey, Siebenaller, 2015; Dong et al., 2018]. Активность цитозольной МДГ у факультативных анаэробов гораздо выше митохондриальной, фермент играет жизненно важную роль в энергетическом обмене у всех эукариот, в том числе и моллюсков [Горомосова, Шапиро, 1984, Gietl, 1992]. Он участвует в генерации и перемещении восстанавливающих эквивалентов между различными субклеточными органеллами, катализирует взаимное превращение оксалоацетата и малата, малат-аспартатный шунт. ЛДГ является терминальным ферментом гликолиза, используется как индикатор интенсивности анаэробного метаболизма. Соотношение активности МДГ и ЛДГ, конкурирующих за цитозольный НАДН, характеризует метаболическую направленность процессов, величина индекса МДГ/ЛДГ в тканях гидробионтов растёт при адаптации к негативным воздействиям [Горомосова, Шапиро, 1984; Bishop, Iliffe, 2012; Головина, 2019]. Каталаза принадлежит к числу наиболее интенсивно изучаемых антиоксидантных ферментов, участвует в первичной защите клеток от окислительного повреждения, отсутствует в анаэробных условиях и индуцируется кислородом [Miroshnichenko, 1992; Hermes-Lima, Zenteno-Savin, 2002; Amira, Sifi, Soltani, 2011]. В настоящей работе исследовали в условиях эксперимента *in vivo* влияние краткосрочной солёностной нагрузки разного уровня на активность оксидоредуктаз – МДГ, ЛДГ и каталазы – в тканях двустворчатого моллюска-вселенца *A. kagoshimensis*.

### Материал и методика

Взрослые особи *A. kagoshimensis* собраны в августе 2021 г. водолазом вручную на глу-

бине 17 м в бухте Ласпи (44°24'46,7" с. ш.; 33°42'19.1" в. д.). Моллюски были полностью погружены в песчано-илистые осадки, их присутствие выдавали небольшие воронки. После транспортировки моллюсков очистили от эпибионтов на створках и поместили в аквариум с проточной морской водой. Высота раковины анадары (от макушки до края створки) составляла от 29.0 до 44.5 мм, длина – от 37.0 до 55.5 мм. Через неделю моллюсков разделили на четыре группы, по 7 экз. в каждой. Необходимую солёность в аквариумах создавали постепенно, растворяя морскую соль (Red Sea Salt, Франция) со скоростью 1‰ в час. Затем в течение двух суток моллюсков подвергли экспозиции к различной солёности: 15‰ (контроль), 25‰, 35‰ и 45‰ при температуре воды в аквариумах 21 °С и постоянной аэрации (6.5±0.3 мг O<sub>2</sub>·л<sup>-1</sup>). Для удаления метаболитов в аквариумах ежедневно обновляли воду, сохраняя величину солёности. Содержание кислорода в воде контролировали с помощью оксиметра ELWRO PRL T N5221 (Польша), солёность – портативным рефрактометром WZ212 (Kelilong Electron Co., China). Моллюсков кормили смесью микроводорослей, содержащей *Isochrysis galbana* Parke, 1949 и *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher, 1959.

Препарирование тканей, гомогенизацию и центрифугирование проводили при охлаждении (0–4 °С). Иссечённые ткани мгновенно замораживали на сухом льду и до последующего биохимического анализа хранили при температуре –80 °С в морозильной камере (Farma 900 Series, TermoScientific, USA). Активность МДГ (L-малат: НАД-оксидоредуктаза; МДГ, 1.1.1.37) и ЛДГ (лактат: НАД-оксидоредуктаза; ЛДГ, 1.1.1.27) измеряли спектрофотометрически при длине волны 340 нм по скорости окисления восстановленной формы кофермента НАДН, используя в качестве среды выделения 0.2 М Трис-НСl буфер, рН 7.5 [Мильман и др., 1974]. Реакцию начинали внесением аликвоты супернатанта, хранящегося во льду, и фиксировали изменение оптической плотности через каждые 30 с в течение 2–3 мин. Субстратом для определения активности ЛДГ служил пируват, для МДГ – оксалоацетат. Активность каталазы (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :

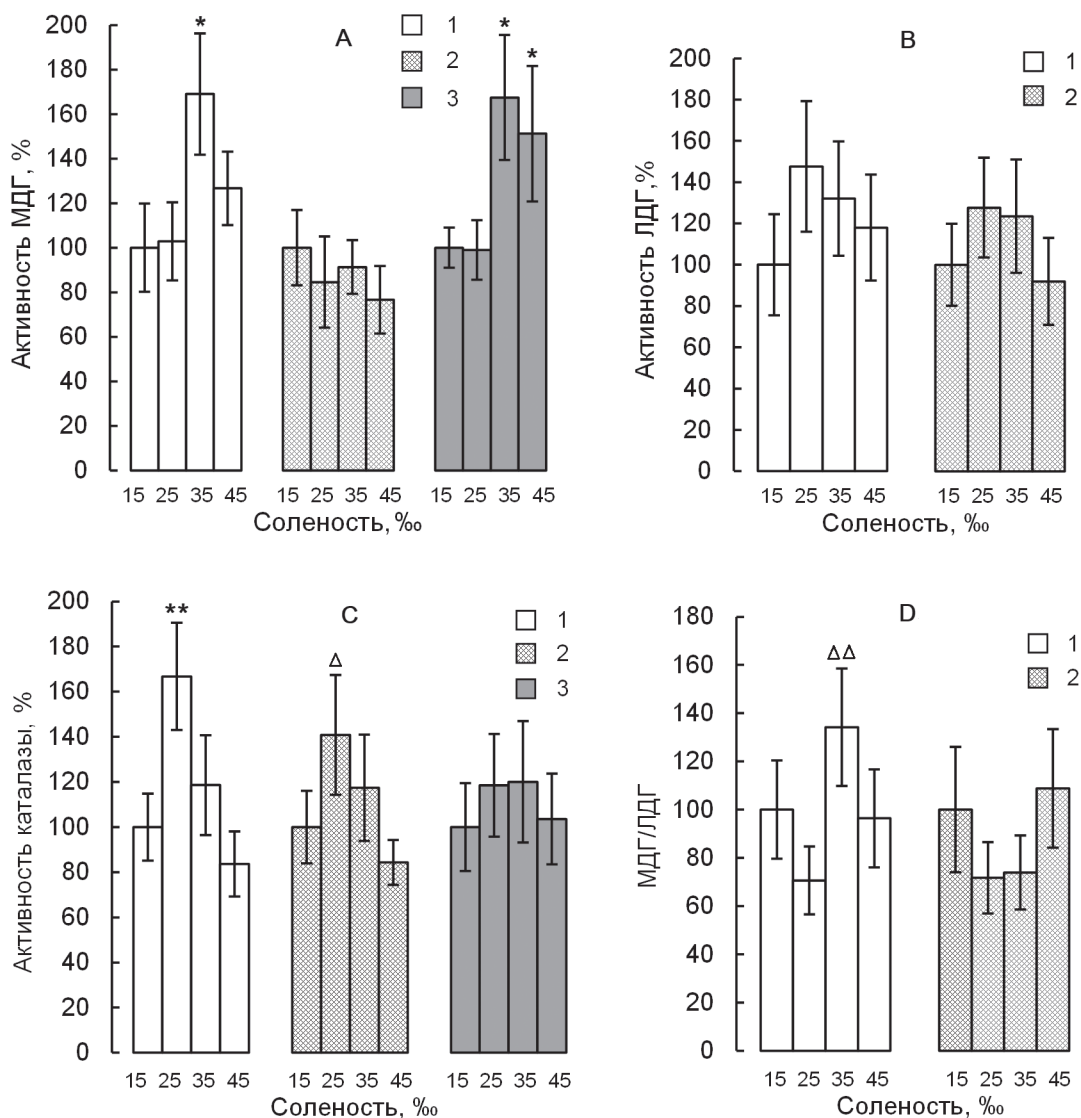
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-оксидоредуктаза; 1.11.1.6) оценивали по изменению экстинции при длине волны 410 нм с помощью метода, основанного на способности пероксида водорода формировать с молибдатом аммония окрашенный комплекс [Гириш, 1999]. Активность ферментов измеряли в цитоплазме тканей при температуре инкубации реакционной смеси 25 °С. Содержание белка определяли микробиуретовым методом, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин. Колориметрическую реакцию проводили при комнатной температуре в течение 15 мин и измеряли оптическую плотность при 330 нм.

Статистическая обработка и графическое оформление полученной информации проводились при помощи стандартного программного обеспечения Microsoft Excel. Результаты представлены как  $\bar{x} \pm SE$ , для всех случаев отбора проб n=7. Для каждого измерения проводили 2–3 повторности, результаты соответствующих повторностей усредняли. Различия считались достоверными при p<0.05. Рассчитывали линейный коэффициент корреляции (r).

## Результаты

В ходе экспериментов установлено изменение активности оксидоредуктаз – МДГ, ЛДГ и каталазы – в тканях анадары под влиянием различной солёности среды. Результаты выражены в процентах по отношению к контролю (15 ‰) соответствующих тканей моллюсков и отражены на рисунке (рис. 1 А – D). Взрослые особи анадары в течение двух суток выдерживали заданный уровень солёности, гибели моллюсков не происходило.

Активность МДГ достигала своего максимального уровня в ноге и гепатопанкреасе моллюска при солёности 35‰, достоверно превысив свои значения в условиях 15 и 25‰ в 1.7 раза (p<0.05) в обеих тканях (рис. 1 А). Дальнейшее увеличение солёности до 45‰ вызвало тенденцию к снижению активности МДГ в ноге и гепатопанкреасе. Характер динамики активности фермента в этих тканях в интервале солёности от 15 до 45‰ был одинаков. Однако в ноге анадары при 45‰ активность МДГ практически вернулась к исходной величине и существенно не отличалась



**Рис. 1.** Влияние солёности на активность малатдегидрогеназы (А), лактатдегидрогеназы (В), каталазы (С) и индекс МДГ/ЛДГ (D) в ноге (1), жабрах (2) и гепатопанкреасе (3) *A. kagoshimensis*. Различия значимы при  $p < 0.05$ : \* – по сравнению с 15 и 25‰; \*\* – по сравнению с 15 и 45‰;  $\Delta$  – по сравнению с 45‰;  $\Delta\Delta$  – по сравнению с 25‰.

от таковой при 15 и 25‰, а в гепатопанкреасе – сохранилась на более высоком уровне по сравнению 15 и 25‰ ( $p < 0.05$ ). В жабрах анадары не зафиксировано значительных колебаний активности МДГ в исследованном диапазоне солёности.

Активность ЛДГ в ноге и жабрах при солёности 25–35‰ увеличивалась на 24–48%, изменения не были статистически значимы, но обе ткани проявили синхронную вариацию активности заключительного фермента гликолиза в широком интервале солёности: от 15 до 45‰ (рис. 1 В). В гепатопанкреасе анадары установлена крайне низкая, следовательно, активность ЛДГ во всех опытах, вследствие чего она не отображена на диаграмме.

Максимальная величина индекса МДГ/ЛДГ выявлена в ноге анадары при 35‰ (рис. 1 D), что в 1.9 раза выше, чем при 25‰ ( $p < 0.05$ ). Увеличение индекса было обусловлено значительным повышением активности МДГ при 35‰ (рис. 1 А). В жабрах соотношение активности ферментов гликолиза демонстрировало V-образную тенденцию к увеличению при солёности 15 и 45‰ как результат снижения активности ЛДГ в этих условиях (рис. 1 В). За исключением опыта при 35‰, величина индекса МДГ/ЛДГ в ноге и жабрах в других экспериментах была практически идентична. Установлена отрицательная корреляция ( $r$ ) в ноге и жабрах между индексом МДГ/ЛДГ и активностью ЛДГ во всех опытах (от  $-0.66$  до  $-0.82$ ,  $p < 0.05$ ).



Реакция каталазы в ноге и жабрах была аналогична динамике активности ЛДГ в этих тканях: максимальная активность каталазы отмечена в интервале солёности 25–35‰ (рис. 1 С). Подобная картина, но с меньшей амплитудой изменений активности каталазы, наблюдалась в гепатопанкреасе. Наибольшие изменения активности каталазы произошли в ноге анадары. По сравнению с контролем активность фермента увеличилась в 1.7 раза при 25‰ ( $p < 0.05$ ), затем снижалась относительно своего максимума: в 1.4 раза при 35‰ и в 2 раза при 45‰ ( $p < 0.05$ ). В жабрах активность каталазы и МДГ положительно коррелировала во всём исследованном диапазоне солёности ( $r = 0.71–0.89$ ,  $p < 0.05$ ). Значительная корреляция в жабрах выявлена также между активностью каталазы и ЛДГ при 25‰ ( $r = 0.72$ ,  $p < 0.05$ ) и 35‰ ( $r = 0.96$ ,  $p < 0.05$ ).

### Обсуждение

Уровень минерализации водной среды ограничивает распространение гидробионтов, влияя на их жизнедеятельность и возможность натурализации в новом водоёме, успех адаптации организмов во многом зависит от способности перестраивать водно-солевой обмен [Berger, Kharazova, 1997; Sokolova et al., 2012]. Чтобы получить более полное представление о механизме солёностной толерантности *A. kagoshimensis* в настоящей работе мы проанализировали реакцию оксидоредуктаз энергетического обмена и антиоксидантной защиты в тканях анадары на изменение солёности от 15 до 45‰, что соответствует диапазону солёности воды в местах естественных поселений вида [Анистратенко, Халиман, 2006; Acarli et al., 2012; Kolyuchkina et al., 2019; Zhivoglyadova et al., 2021]. В соответствии с нашими результатами, активность МДГ в ноге и гепатопанкреасе *A. kagoshimensis* достигала максимальной величины в условиях нативной океанической солёности – 35‰, что свидетельствует об увеличении метаболической активности при оптимальной солёности для вселенца, а также о возможности значительной вариации активности фермента даже в небольшом временном масштабе. Активность МДГ в жабрах анадары обладала большей устойчи-

востью по сравнению с тканями ноги и гепатопанкреаса к кратковременному изменению солёности, аналогичные результаты были получены нами ранее в условиях экспериментального воздействия сероводорода [Головина, 2019]. Сохранение высокой активности МДГ в тканях обусловлено преадаптацией гидробионтов к анаэробизму [Bishop, Piffie, 2012; Somero et al., 2017]. Для двустворчатого моллюска *Potamocorbula amurensis* (= *Corbula amurensis*) (Schrenck, 1862), инвазивного вида в заливе Сан-Франциско (США), установлено, что активность МДГ положительно коррелировала с солёностью в тканях ноги и мантии при акклимации к солёности 2‰, 14‰ (контроль) и 28‰ [Paganini et al., 2010]. В интервале от низкой до высокой солёности активность МДГ достоверно увеличивалась в ноге и мантии на 18 и 38%, соответственно. Средняя скорость фильтрации у *P. amurensis* при 28‰ была вдвое выше, чем при 2‰ ( $p < 0.05$ ). Сообщается, что у *A. kagoshimensis* (= *Scapharca subcrenata*) (Lischke, 1869) в процессе акклимации (14–20 дней) по мере снижения солёности от 33‰ (нативная) до 13‰ наблюдались гистологические изменения в мантии и жабрах вплоть до некроза и вакуолизации эпителия и отпадения ресничек [Shin et al., 2009]. Соотношение между потребляемым кислородом и выделяемым азотом в атомных эквивалентах (отношение O/N) в данном эксперименте варьировало от 27 до 1, при этом значения уменьшались с уменьшением солёности, что свидетельствует об увеличении использования белка как источника энергии при адаптации к более низкой солёности.

Помимо участия в энергетическом обмене аминокислоты и их катаболиты используются морскими моллюсками в качестве осмолитов [Yancey et al., 1982; Carregosa et al., 2014]. Органические осмолиты в отличие от солей не разрушают макромолекулы даже при высоких концентрациях и эвригалинные виды накапливают их. По-видимому, это сыграло положительную роль в адаптации *A. kagoshimensis* как тепловодной формы морей Индо-Пацифики к более низкой температуре и солёности Чёрного моря, так как в жабрах и гепатопанкреасе успешного вселен-

ца содержание аминокислот в 2.8–5.4 раза, а мочевины – в 20–27 раз выше по сравнению с аборигенной мидией *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 [Soldatov et al., 2010], приспособленной к более узкому диапазону солёности (14–27‰) [Шурова, 2013]. Многие органические осмолиты обладают цитопротекторными свойствами, что, возможно, способствует относительно стабильной активности оксидоредуктаз анадары в широком диапазоне солёности. Так, упомянутый осмолит мочевины является низкомолекулярным антиоксидантом, естественным криопротектором, влияет на конформационную структуру и функцию ферментов, в том числе ЛДГ, способен образовывать клатратную сеть, связывать ионы металлов переменной валентности и защищать от токсичности сульфидов. [Стид, Этвуд, 2007; Yancey, Siebenaller, 2015]. Предполагают, что различные смеси осмолитов служат для детоксикации сульфидных радикалов и/или хранения сульфидов для будущего использования сульфидокисляющими микробными эндосимбионтами в жабрах моллюсков, подобно анадаре, обитающих в осадочных породах [Gainey, Greenberg, 2005; Yancey, Siebenaller, 2015]. Благодаря органическим осмолитам морские беспозвоночные выживают при высоких осмолальностях несмотря на постоянные разрывы ДНК, число которых коррелирует с повышением содержания внутриклеточных неорганических ионов [Dmitrieva et al., 2006].

В пределах экологически значимого диапазона солёность обычно оказывает умеренное влияние на биоэнергетические потребности водных беспозвоночных [Sokolova et al., 2012]. Согласно нашим данным, активность ЛДГ и каталазы понижается при отклонении солёности от оптимальной (25–35‰), что согласуется с характерной для моллюсков способностью снижать интенсивность метаболизма в ответ на воздействие неблагоприятных факторов среды [Горомосова, Шапиро, 1984; Высоцкая и др., 2005; Yusseppone et al., 2018; Головина, 2019]. Установленная тенденция к росту индекса МДГ/ЛДГ в тканях анадары в условиях пониженной и повышенной солёности также является неспецифической реакцией моллюсков на многие

воздействия внешней среды и обусловлена, в основном, снижением активности ЛДГ, что позволяет моллюскам избегать чрезмерного накопления лактата и сохранять кислотно-щелочной баланс в тканях. Отрицательная корреляция между величиной индекса МДГ/ЛДГ и активностью ЛДГ в наших опытах иллюстрирует этот процесс. Незначительное снижение активности каталазы при 15 и 45‰ указывает на отсутствие окислительного стресса и отражает устойчивость анадары к широкому диапазону солёности. Показана тенденция к снижению активности каталазы у штаммов с разной окраской раковины у манильского моллюска *Ruditapes philippinarum* (A. Adams & Reeve, 1850) с уменьшением солёности в течение суток с 30 до 5‰ [Nie et al., 2020]. Такой тип реакции встречается у животных с высоким уровнем антиоксидантной защиты [Hermes-Lima, Zenteno-Savin, 2002; Yusseppone et al., 2018]. Примечательно, что характер динамики скорости фильтрации и дыхания двустворчатого моллюска-вселенца *Brachidontes pharaonis* (P. Fischer, 1870) при солёности 15, 25, 37 и 45‰ представляет собой куполообразную кривую [Sarà et al., 2008], что совпадает с изменением активности ЛДГ и каталазы в том же интервале солёности в тканях *A. kagoshimensis* в наших опытах. Относительно высокая активность МДГ и незначительное снижение активности ЛДГ предполагает сохранение доминирующей роли аэробного энергетического пути у *A. kagoshimensis* в условиях кратковременной солёностной нагрузки. По-видимому, стабильный уровень активности МДГ в жабрах при различной солёности обусловлен способностью анадары экономно потреблять кислород даже в условиях нормоксии [Soldatov et al., 2010]. Сообщается, что активность МДГ положительно коррелирует со скоростью потребления кислорода у моллюсков и может быть альтернативным показателем скорости дыхания и фильтрации [Dahlhoff et al., 2002; Sokołowski et al., 2021]. Производство оксалоацетата и малата зависит от интенсивности аэробного метаболизма (дыхания митохондрий) и активности цитозольной МДГ: повышенная активность митохондриальной цепи электронного транспорта приводит к росту

активности малатного пути шунтирования, где малат переносится в цитозоль и превращается обратно в оксалоацетат цитозольной МДГ [Gagné et al., 2009]. Установленная положительная корреляция между активностью оксидоредуктаз и каталазы в жабрах *A. kagoshimensis*, схожий характер динамики активности ЛДГ и каталазы в тканях ноги и жабр свидетельствуют о функциональной связи и сбалансированности процессов энергетического обмена и антиоксидантной (АО) защиты в тканях вселенца в исследованном диапазоне солёности. Известно, что *A. kagoshimensis* способна поддерживать необходимый уровень окислительных процессов и АО защиты, благодаря эритроцитарному гемоглобину, значительному пулу каротиноидов и других низкомолекулярных антиоксидантов, а также эффективности ферментов АО системы [Gostyukhina et al., 2013; Golovina et al., 2016].

В то же время, в тканях инвазивного для прибрежной системы Португалии манильского двустворчатого моллюска *R. philippinarum* максимальный уровень глюкозы и гликогена установлен при 35‰ [Carregosa et al., 2014]. Изменение солёности в сторону снижения или повышения приводило к значительному уменьшению содержания этих субстратов; результаты показали также значительное снижение содержания белка при более низких солёностях. Авторы объясняют это высокими энергетическими затратами *R. philippinarum* на осморегуляцию за пределами оптимальной солёности и аноксическим состоянием, которое испытывает моллюск из-за закрытия створок раковины как механизма, позволяющего кратковременно выдерживать сублетальную солёность. Солёность может повышать перекисное окисление липидов и индуцировать/ингибировать механизмы детоксикации в зависимости от вида *Bivalvia* [Velez et al., 2016]. Воздействие как пониженной, так и повышенной солёности приводит к изменению уровня белка, глюкозы, гликогена и ионов с важными биологическими функциями, что отражается на показателях роста моллюсков и означает более низкую продуктивность в тех областях экосистемы, где неоптимальная солёность [Yancey et al., 1982, Acarli et

al., 2012; Carregosa et al., 2014]. Установлено, что выживаемость арки *A. kagoshimensis* (= *S. subcrenata*) при пониженной солёности (ниже 13‰) резко падает, хотя и зависит от температуры воды и продолжительности воздействия гипотонической среды [Shin et al., 2009]. Сообщается, что в современный период осолонения Азовского моря до 14‰ и возрастающего обогащения донных осадков органическим веществом произошло превращение фильтратора-сестонофага, вселенца *A. kagoshimensis* в доминирующий вид в бентосе региона, в то время как в периоды опреснения до 9–10‰ численность и биомасса анадары снижалась [Zhivoglyadova et al., 2021; Болтачева и др., 2022]. Как показано для лессепского мигранта индо-тихоокеанского вида митилиды *B. pharaonis* фактор солёности может иметь решающее значение при всех тестируемых температурах [Sarà et al., 2008]. Моллюски могут модулировать свою биохимию/физиологию, чтобы компенсировать изменение как солёности, так и температуры, но ухудшение состояния и смертность возникают, когда эти факторы достигают экстремальных величин и меняются в унисон, что установлено на примере *Anadara trapezia* (Deshayes, 1839) [Taylor et al., 2017].

### Заключение

Полученные результаты характеризуют *A. kagoshimensis* как устойчивого к широкому диапазону солёности океанического вселенца в Чёрное море. Кратковременное изменение солёности за пределами оптимальной для анадары (25–35‰) приводит к снижению активности оксидоредуктаз (МДГ, ЛДГ, каталазы) и росту индекса МДГ/ЛДГ, неспецифической реакции моллюсков на негативные воздействия внешней среды. Снижение активности ферментов энергетического обмена в тканях *A. kagoshimensis* может быть одной из причин замедления роста моллюсков и падения продуктивности в водоёмах, где солёность не оптимальна. Результаты свидетельствуют о способности анадары поддерживать энергосберегающую адаптационную стратегию в условиях умеренного осмотического стресса, позволяют получить более полное представление о механизмах солёностной толерантно-



сти вселенца и могут быть использованы как базовая информация для мониторинговых исследований и управления аквакультурой моллюсков.

### Благодарности

Автор признательна Оксане Юрьевне Вяловой, к. б. н., ст. н. с. отдела физиологии животных и биохимии ФИЦ ИнБЮМ, за организацию сбора моллюсков в полевых условиях и доставку их в лабораторию.

### Финансирование работы

Исследование выполнено в рамках госзадания ФГБУН ФИЦ ИнБЮМ «Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом», номер гос. регистрации НИОКТР 121041400077-1.

### Конфликт интересов

Автор заявляет, что у него нет конфликта интересов.

### Соблюдение этических стандартов

Все экспериментальные протоколы были выполнены в соответствии с руководящими принципами ЕС по использованию лабораторных животных и уходу за ними (86/609 / СЕЕ) и при соблюдении правил, утверждённых распоряжением Президиума АН СССР от 2 апреля 1980 № 12000-496 и приказом Минвуза СССР от 13 сентября 1984 № 22. Все усилия были предприняты, чтобы использовать только минимальное количество животных, необходимое для получения надёжных научных данных.

### Литература

Анистратенко В.В., Халиман И.А. Двустворчатый моллюск *Anadara inaequalis* (BIVALVIA, ARCIDAE) в северной части Азовского моря: завершение колонизации Азово-Черноморского бассейна // Вестник зоологии. 2006. Т. 40. № 6. С. 505–511.

Болтачева Н.А., Ревков Н.К., Надольный А.А., Аннинская И.Н. Донная фауна юго-западной части Азовского моря. Таксономический состав макрозообентоса и его биоценотическая структура в 2016–2017 гг. // Морской биологический журнал. 2022. Т. 7. № 2. С. 3–22. <https://doi.org/10.21072/mbj.2022.07.2.01>

Высоцкая Р.У., Ломаева Т.А., Такшеев С.А., Амелина В.С., Бахмет И.Н. Активность лизосомальных и некоторых других ферментов в тканях мидий при разном уровне солёности // Проблемы изучения, рационального использования и охраны ресурсов Белого моря. Петрозаводск: Издательский дом ПИН, 2005. С. 72–75.

Гирин С.В. Модификация метода определения активности каталазы в биологических субстратах // Лабораторная диагностика. 1999. № 4. С. 45–46.

Головина И.В. Устойчивость к негативным воздействиям и соотношение активности ферментов энергетического обмена в тканях черноморских моллюсков *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 и *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) // Морской биологический журнал. 2019. Т. 4. № 3. С. 37–47. <https://doi.org/10.21072/mbj.2019.04.3.04>

Горомосова С.А., Шапиро А.З. Основные черты биохимии энергетического обмена мидий. М.: Лёгкая и пищевая промышленность, 1984. 120 с.

Киселёва М.И. Сравнительная характеристика донных сообществ у побережья Кавказа // Многолетние изменения зообентоса Чёрного моря. Киев: Наукова думка, 1992. С. 84–99.

Мильман Л.С., Юровецкий Ю.Г., Ермолаева Л.П. Определение активности важнейших ферментов углеводного обмена // Методы биологии развития. М., 1974. С. 346–364.

Стид Дж.В., Этвуд Дж.Л. Супрамолекулярная химия. М.: Академкнига, 2007. Т. 1. 480 с.

Шурова Н.М. Структурно-функциональная организация популяции мидий *Mytilus galloprovincialis* Чёрного моря. Киев: Наукова думка, 2013. 206 с.

Acarli S., Lok A., Yigitkurt S. Growth and Survival of *Anadara inaequalis* (Bruguiere, 1789) in Sufa Lagoon, Izmir, Turkey // The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgheh. 2012. Vol. 64. P. 2–7. <http://hdl.handle.net/10524/23598>

Amira A., Sifi K., Soltani N. Measure of environmental stress biomarkers in *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from the gulf of Annaba (Algeria) // European Journal of Experimental Biology. 2011. No. 2. P. 7–16. // (<http://www.pelagiaresearchlibrary.com>)

Berger V.J., Kharazova A.D. Mechanisms of salinity adaptations in marine molluscs // Hydrobiologia. 1997. Vol. 355. P. 115–126.

Bishop R.E., Piffé T.M. Ecological physiology of the anchialine shrimp *Barbouria cubensis*: a comparison of epigeal and hypogean populations // Marine Biodiversity. 2012. Vol. 42, iss. 3. P. 303–310. <https://doi.org/10.1007/s12526-012-0113-8>

Carregosa V., Figueira E., Gil A.M., Pereira S., Pinto J., Soares A.M., Freitas R. Tolerance of *Venerupis philippinarum* to salinity: osmotic and metabolic aspects // Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular & Integrative Physiology. 2014. Vol. 171. P. 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.02.009>

Dahlhoff E.P., Stillman J.H., Menge B.A. Physiological community ecology: variation in metabolic activity of ecologically important rocky intertidal invertebrates



- along environmental gradients // Integrative and Comparative Biology. 2002. Vol. 42. No. 4. P. 862–871. <https://doi.org/10.1093/icb/42.4.862>
- Dmitrieva N.I., Ferraris J.D., Norenburg J.L., Burg M.B. The saltiness of the sea breaks DNA in marine invertebrates: possible implications for animal evolution // Cell Cycle. 2006. Vol. 5. P. 1320–1323. <https://doi.org/10.4161/cc.5.12.2867>
- Dong Y., Liao M., Meng X., Somero G.N. Structural flexibility and protein adaptation to temperature: Molecular dynamics analysis of malate dehydrogenases of marine molluscs // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2018. Vol. 115. No. 6. P. 1274–1279. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718910115>
- Gainey L.F.Jr, Greenberg M.J. Hydrogen Sulfide Is Synthesized in the Gills of the Clam *Mercenaria mercenaria* and Acts Seasonally to Modulate Branchial Muscle Contraction // The Biological Bulletin. 2005. Vol. 209. No. 1. P. 11–20. <https://doi.org/10.2307/3593138>
- Gagné F., André C., Blaise C., Pellerin J., Sherry J., Talbot A. An investigation on the disruptive effect of pollution in cold-and warm-adapted clam populations // Invertebrate Survival Journal. 2009. Vol. 6. No. 2. P. 144–153.
- Gietl C. Malate dehydrogenase isoenzymes: cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles // Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. 1992. Vol. 1100. No. 3. P. 217–234. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(92\)90476-T](https://doi.org/10.1016/0167-4838(92)90476-T)
- Golovina I.V., Gostyukhina O.L., Andreyenko T.I. Specific Metabolic Features in Tissues of the Ark Clam *Anadara kagoshimensis* Tokunaga, 1906 (Bivalvia: Arcidae), a Black Sea Invader // Russian Journal of Biological Invasions. 2016. Vol. 7. No. 2. P. 137–145. <https://doi.org/10.1134/S2075111716020065>
- Gostyukhina O.L., Soldatov A.A., Golovina I.V., Borodina A.V. Content of carotenoids and the state of tissue antioxidant enzymatic complex in bivalve mollusc *Anadara inaequalis* Br. // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2013. Vol. 49. Iss. 3. P. 309–315. <https://doi.org/10.1134/S0022093013030055>
- Haider F., Sokolov E.P., Timm S., Hagemann M., Rayon E.B., Marigomez I., Izagirre U., Sokolova I.M. Interactive effects of osmotic stress and burrowing activity on protein metabolism and muscle capacity in the soft shell clam *Mya arenaria* // Comparative Biochemistry and Physiology. 2019. Part A. Vol. 228. P. 81–93. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.10.022>
- Hermes-Lima M., Zenteno-Savin T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress // Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology. Pharmacology. 2002. Vol. 133. No. 4. P. 537–556.
- Kladchenko E.S., Andreyeva A.Yu., Kukhareva T.A., Rychkova V.N., Soldatov A.A., Mindukshev I.V. Impact of Low Salinity on Hemocytes Morphology and Functional Aspects in Alien Clam *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) // Russian Journal of Biological Invasions. 2021. Vol. 12. Iss. 2. P. 203–212. <https://doi.org/10.1134/S2075111721020089>
- Kolyuchkina G.A., Syomin V.L., Spiridonov V.A., Zalota A.K., Biryukova S.V., Basin A.B., Simakova U.V., Nabozhenko M.V. The resilience of macrozoobenthos of boreal coastal lagoons to non-indigenous species invasion: A case study of Taman Bay (the Sea of Azov) // Regional Studies in Marine Science. 2019. Vol. 28. P. 100573. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2019.100573>
- Krapal A.-M., Popa O.P., Levarda A.F., Iorgu E.I., Costache M., Crocetta F., Popa L.O. Molecular confirmation on the presence of *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) (Mollusca: Bivalvia: Arcidae) in the Black Sea // Travaux du Museum National d'Histoire Naturelle «Grigore Antipa». 2014. Vol. 57. No. 1. P. 9–12. <https://doi.org/10.2478/travmu-2014-0001>
- Miroshnichenko O.S. Biogenesis, physiological role, and properties of catalase // Biopolymers and cell. 1992. Vol. 8. No. 6. P. 3–25. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00033C>
- Nie H., Jahan K., Zhang W., Huo Z., Yan X. Physiological and biochemical responses of different shell color strains of Manila clam to low salinity challenges // Aquaculture Reports. 2020. Vol. 16. P. 100260. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100260>
- Paganini A., Kimmerer W.J., Stillman J.H. Metabolic responses to environmental salinity in the invasive clam *Corbula amurensis* // Aquatic Biology. 2010. Vol. 11. P. 139–147. <https://doi.org/10.3354/ab00304>
- Rinaldi E. *Rapana venosa* (Valenciennes) spiaggiata in notevole quantità sulla spiaggia di Rimini (Fo) // Bollettino Malacologico. 1985. Vol. 16. P. 9–17.
- Sarà G., Romano C., Widdows J., Staff F.J. Effect of salinity and temperature on feeding physiology and scope for growth of an invasive species (*Brachidontes pharaonis* – Mollusca: Bivalvia) within the Mediterranean sea // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 2008. Vol. 363. No. 1–2. P. 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2008.06.030>
- Shin Y.K., Lee W.C., Jun R.H., Kim S.Y., Park J.J. Survival of the ark shell *Scapharca subcrenata* and physiological and histological changes at decreasing salinity // Fisheries and Aquatic Sciences. 2009. Vol. 12. No. 3. P. 209–218. <http://dx.doi.org/10.5657/fas.2009.12>
- Sokolova I.M., Sukhotin A.A., Lannig G. Stress effects on metabolism and energy budgets in mollusks // In: Abele D., Vazquez-Medina J.P., Zenteno-Savín T. (Eds.), Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems, Part IV. Blackwell Publishing Ltd., 2012. P. 263–280. <https://doi.org/10.1002/9781444345988.ch19>
- Sokołowski A., Świeżak J., Hallmann A., Olsen A.J., Ziółkowska M., Øverjordet I.B., Nordtug T., Altin D., Krause D.F., Salaberria I., Smolarz K. Cellular level response of the bivalve *Limecola balthica* to seawater acidification due to potential CO<sub>2</sub> leakage from a sub-seabed storage site in the southern Baltic Sea: TiTank experiment at representative hydrostatic pressure // Science of the Total Environment. 2021. Vol. 794. P. 148593. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148593>
- Soldatov A.A., Andreenko T.I., Golovina I.V., Stolbov A.Y. Peculiarities of organization of tissue metabolism in molluscs with different tolerance to external hypoxia // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology.

2010. Vol. 46. No. 4. P. 341–349. <https://doi.org/10.1134/S0022093010040022>
- Somero G.N. The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine ‘winners’ and ‘losers’ // *Journal of Experimental Biology*. Special is. 2010. Vol. 213. P. 912–920. <https://doi.org/10.1242/jeb.037473>
- Somero G.N., Lockwood B.L., Tomanek L. *Biochemical adaptation: response to environmental challenges from life’s origins to the anthropocene*. Sunderland: Sinauer Associates, 2017. P. 572.
- Strafella P., Ferrari A., Fabi G., Salvalaggio V., Punzo E., Cuicchi C., Santelli A., Cariani A., Tinti F., Tasseti A.N., Scarcella G. *Anadara kagoshimensis* (Mollusca: Bivalvia: Arcidae) in Adriatic Sea: morphological analysis, molecular taxonomy, spatial distribution, and prediction // *Mediterranean Marine Science*. 2017. Vol. 18. No. 3. P. 443–453. <https://doi.org/10.12681/mms.1933>
- Suzuki H., Yamaguchi K., Seto K. Effect of Hypoxia and Low Salinity on Growth and Survival of the Ark Shell *Scapharca kagoshimensis* through the Field Experiment in Lake Nakaumi, Southwest Japan // *Aquaculture Science*. 2012. Vol. 60. No. 2. P. 261–268. <https://doi.org/10.11233/aquaculturesci.60.261>
- Taylor A.M., Maher W.A., Ubrihien R.P. Mortality, condition index and cellular responses of *Anadara trapezia* to combined salinity and temperature stress // *Journal of experimental marine biology and ecology*. 2017. Vol. 497. P. 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2017.09.023>
- Velez C., Figueira E., Soares A.M., Freitas R. Native and introduced clams biochemical responses to salinity and pH changes // *Science of the Total Environment*. 2016. Vol. 566. P. 260–268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.019>
- Wang Q., Xie X., Zhang M., Teng W., Liang M., Kong N., Wang C., Zhou Z. Effects of temperature and salinity on survival and growth of juvenile ark shell *Anadara broughtonii* // *Fisheries Science*. 2017. Vol. 83. P. 619–624. <https://doi.org/10.1007/s12562-017-1095-z>
- Yancey P.H., Clark M.E., Hand S.C., Bowlus R.D., Somero G.N. Living with water stress: evolution of osmolyte systems // *Science*. 1982. Vol. 217. No. 4566. P. 1214–1222. <https://doi.org/10.1126/science.7112124>
- Yancey P.H., Siebenaller J.F. Co-evolution of proteins and solutions: protein adaptation versus cytoprotective micromolecules and their roles in marine organisms // *The Journal of experimental biology*. 2015. Vol. 218. No. 12. P. 1880–1896. <https://doi.org/10.1242/jeb.114355>
- Yusseppone M.S., Rocchetta I., Sabatini S.E., Luquet C.M., Ríos de Molina M.D.C., Held C., Abele D. Inducing the alternative oxidase forms part of the molecular strategy of anoxic survival in freshwater bivalves // *Frontiers in physiology*. 2018. Vol. 9. P. 100–112. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00100>
- Zhang M., Li L., Liu Y., Gao X. Effects of a Sudden Drop in Salinity on Immune Response Mechanisms of *Anadara kagoshimensis* // *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20. No. 18. P. 4365–4384. <https://doi.org/10.3390/ijms20184365>
- Zhivoglyadova L.A., Revkov N.K., Frolenko L.N., Afanasyev D.F. The Expansion of the Bivalve Mollusk *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) in the Sea of Azov // *Russian Journal of Biological Invasions*. 2021. Vol. 12. No. 2. P. 192–202. <https://doi.org/10.1134/S2075111721020120>

# EFFECT OF SALINITY ON THE ACTIVITY OF OXIDOREDUCTASES IN TISSUES OF THE ARK CLAM ANADARA KAGOSHIMENSIS (TOKUNAGA, 1906), A BLACK SEA INVADER

© 2023 Golovina I.V.

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of the RAS, Sevastopol, 299011, Russia  
e-mail: ivgolovina@mail.ru

Effect of salinity on the activity of the enzymes of energy metabolism and antioxidant protection: malate dehydrogenase (MDH, 1.1.1.37), lactate dehydrogenase (LDH, 1.1.1.27), and catalase (1.11.1.6) was studied in the tissues of anadara. Four groups of adult molluscs (shell length of 37.0–55.5 mm) were exposed to different salinity (15‰, 25‰, 35‰ and 45‰) for two days at a water temperature of 21 °C and constant aeration ( $6.5 \pm 0.3$  mg O<sub>2</sub>/L). MDH activity reached its maximum value in the tissue of the foot and hepatopancreas at a native salinity for the invader – 35‰, that exceeded 1.7-fold ( $p < 0.05$ ) its values under 15 and 25‰ in both tissues; in the gills that activity of the enzyme remained at a constant level. A trend towards an increase in LDH activity in the foot and gills by 24–48% was found under salinity of 25–35‰ against the background of extremely low activity of the enzyme in the hepatopancreas in all experiments. A negative correlation ( $r$ ) between the MDH/LDH index and LDH activity (from  $-0.66$  to  $-0.82$ ,  $p < 0.05$ ) was found in the foot and gills. The maximum activity of catalase in the foot, gills, and hepatopancreas was noted in the salinity range of 25–35‰. In the gills, a significant correlation was found between the activity of catalase and LDH at 25‰ ( $r = 0.72$ ,  $p < 0.05$ ) and 35‰ ( $r = 0.96$ ,  $p < 0.05$ ), as well as the activity of catalase and MDH ( $r = 0.71$ – $0.89$ ,  $p < 0.05$ ) over the studied salinity range. In the anadara a synchronous decrease in the activity of oxidoreductases beyond the optimal salinity (25–35‰) may be one of the reasons for the slowdown in the growth of molluscs in water bodies where salinity is not optimal.

**Key words:** Bivalvia, Arcidae, alien species, salinity tolerance, metabolic markers, Black Sea.