

УДК 591.34:597.851/544.02:543.51

ИЗМЕНЕНИЯ ЭЛЕМЕНТНОГО И ИЗОТОПНОГО СОСТАВА, СОПРОВОЖДАЮЩИЕ ЛИЧИНОЧНЫЙ РОСТ И МЕТАМОРФОЗ ОСТРОМОРДОЙ ЛЯГУШКИ

© 2017 г. Ю. К. Доронин^{а, *}, А. В. Тиунов^б, Е. Н. Калистратова^а

^аМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова
119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

^бИнститут проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН
119071, Москва, Ленинский проспект, 33

*E-mail: ljh_rjusp@mail.ru

Поступила в редакцию 29.08.2016 г.

Разнообразие событий раннего онтогенеза бесхвостых амфибий (рост, структурная и биохимическая диверсификация, метаморфоз) предоставляет уникальную возможность для оценки эффективности и пределов применения масс-спектрометрического метода для анализа событий обмена и превращений веществ в развивающихся организмах. Мы проследили динамику относительного содержания углерода и азота и стабильных изотопов этих элементов по мере личиночного развития, в период метаморфического климакса и после его завершения у особей остромордой лягушки, развивавшихся в естественной среде обитания и *in vitro* на референтной диете. Снижение C/N, обогащение тканей тяжелыми стабильными изотопами углерода и азота в течение эмбрионального и личиночного развития (до начала самостоятельного питания) свидетельствуют об увеличении доли и разнообразия белков, сопровождающихся расходом желточных липидов. Параллельно с ростом и развитием самостоятельно питающихся головастиков растет относительное содержание азота и снижается C/N, что указывает на опережающее увеличение доли белков в тканях. Темпы обновления тканей в целом и темпы оборота белков в частности у растущих головастиков отражаются в кинетике изменения изотопного состава тканей, приближающегося к изотопному составу потребляемой пищи. Снижение C/N в образцах тела метаморфов в период массивного распада тканей указывает на продолжающуюся реконструкцию личиночных органов и рост закладок дефинитивных органов. Значительный рост C/N и обеднение тяжелым изотопом углерода образцов печени связаны с интенсивным синтезом и резервированием жиров в органе. Выраженное обогащение тканей метаморфов тяжелым изотопом азота знаменует замену аммонийного типа азотистого обмена на уротелический. Снижение C/N и обогащение тканей тяжелым изотопом углерода могут быть связаны с интенсивным окислением липидов, обеспечивающим возросшие энергетические траты наземных сеголетков. Относительное содержание тяжелого изотопа азота в тканях сеголетков не изменяется в сравнении с тканями метаморфов.

Ключевые слова: бесхвостые амфибии, личиночное развитие, метаморфоз, стабильные изотопы, углерод, азот

DOI: 10.7868/S0475145017010050

ВВЕДЕНИЕ

Биологическое фракционирование изотопов находит специфическое отражение на всех уровнях организации гетеротрофов. Фракционирование биогенных элементов на уровне целостного организма связано с вещественным обменом между организмом и внешней средой. Именно этот аспект получил максимальное развитие, превратившись в самостоятельную методологию, раскрывающую трофические отношения организмов в экосистемах (DeNiro, Epstein, 1978, 1981; Peterson, Fry, 1987; Gannes et al., 1997 и мн. др.). Различия изотопного состава органов не вызывает сомнений, так

же как то, что предопределяется оно как функциональной (метаболической) специализацией органов, так и межорганным обменом веществом (Tieszen et al., 1983). Менее исследовано фракционирование на уровне клеток (как прокариотных, так и эукариотных), а обнаруженные феномены часто не находят достаточно убедительного объяснения (Blair et al., 1985; McGoldrick et al., 2008). На субклеточном уровне раскрываются базовые механизмы, лежащие в основе биологического фракционирования на высших уровнях: кинетический и магнитно-ядерный изотопные эффекты

при биохимических превращениях веществ (Galimov, 1985; Бучаченко, 2007).

Онтогенез предоставляет уникальную возможность для оценки событий изотопного фракционирования по мере становления структурной иерархии организма. И наоборот: динамика элементного состава и фракционирования стабильных изотопов может оказаться уникальным свидетельством ключевых событий метаболизма при усложнении структуры и изменениях функциональных возможностей организма на онтогенезе. Систематические исследования фракционирования изотопов в развивающихся организмах немногочисленны (см., например, Fry, Arnold, 1982; Vander Zanden et al., 1998; Genner et al., 2003; Doi et al., 2007; Tibbets et al., 2008; Doronin et al., 2012).

События раннего онтогенеза классических объектов биологии развития – головастиков и лягушек – исследованы достаточно полно. Однако сведения об изотопном составе амфибий представлены только в нескольких работах (Kupfer et al., 2006; Verburg et al., 2007; Jefferson, Russel, 2008; Schiesari et al., 2009; Trakimas et al., 2011; Caut et al., 2013; Schriever, Williams, 2013), ориентированных не столько на события онтогенеза, сколько на исследование роли амфибий в переносе веществ между наземными и водными экосистемами. Элементный и изотопный состав превращающихся бесхвостых амфибий, насколько нам известно, ранее не исследовался.

Ниже изложены результаты измерений относительного содержания углерода, азота и стабильных изотопов этих элементов по мере личиночного развития, в период метаморфического климакса и после его завершения у особей остромордой лягушки, развивавшихся в естественной среде обитания и *in vitro* на референтной диете.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор природного материала

Материал для исследования был собран в 2012–2013 гг. из небольшого лесного болота в Истринском районе Московской области, в котором в течение многих лет массово размножается *Rana arvalis* Nilsson. Из природы собирали личинок до начала их самостоятельного питания, приступивших к самостоятельному питанию и активно питающихся головастиков. Стадию развития (по Gosner, 1960) каждого из головастиков определяли сразу после отлова. Метаморфов (превращающихся головастиков) с явными признаками резорбции хвоста и наземных сеголетков отлавливали в середине июля, сразу после их массового появления, и в последних числах августа. Для оценки прогресса в резорбции хвоста отловленных метаморфов фотографировали с вентральной стороны. На изображениях измеряли общую дли-

ну (от кончика морды до кончика хвоста, L) и длину хвоста (от кончика хвоста до клоакального отверстия, T). Изменение относительной длины тела ($1 - T/L$) служило мерой прогресса метаморфического климакса.

В развитии амфибий отчетливо проявляется известное явление фенотипической пластичности (см. детали в Love, 2010). Феномен состоит в том, что одновозрастные зародыши и личинки развиваются асинхронно. В соответствии с этим, в одномоментной пробе оказываются головастики на различных стадиях развития. Это явление позволило сопоставление изотопного состава и уровня организации (стадий развития) фактически одновозрастных личинок.

Для определения потенциальных источников пищи собирали пробы погруженного детрита: деградированные остатки листового опада и тонкодисперсный органический осадок. Соскобы с поверхности трех керамических плиток (13×36 см), которые в течение трех недель были погружены в воду в прибрежной зоне центрального водоема болота, послужили образцами обрастаний. В обрастаниях доминировали *Characium* sp. и *Stigeoclonium* sp.

Содержание головастиков in vitro

Около 100 оплодотворенных икринок из трех одновременных свежих кладок доразвивали до вылупления личинок. Вылупившихся личинок распределяли (случайным образом, вне зависимости от принадлежности к кладкам) по 30 штук в три отдельных аквариума с двумя литрами отфильтрованной воды. Питающихся головастиков кормили *ad libitum* разваренной кукурузной крупой (“Увелка”). (Кукуруза – C4 растение, обогащенное тяжелым изотопом углерода.) Согласно спецификации (ГОСТ) продукт содержит: 9.5% белков, 1.4% жиров, 82.5% крахмала, 0.93% целлюлозы. Пищевая ценность – 16.54 кДж/г (все значения представлены в пересчете на беззольный сухой вес). Для максимального приближения к естественным условиям обитания, аквариумы с головастиками были размещены на открытом воздухе, под навесом в непосредственной близости с лесным болотом. Через каждые два дня головастиков переносили в чистые аквариумы со свежей пищей. Метаморфоз успешно завершила треть от исходной численности подопытных головастиков.

Подготовка образцов и масс-спектрометрические измерения

Кишечную трубку полностью удаляли из тела каждого взятого для анализа головастика, метаморфа и сеголетка. Из тела метаморфов и сеголеток извлекали печень. Образцы тканей тела и пече-

Характеристика и объем исследованного материала

Образцы	Количество и структура образцов	Возраст (сутки после оплодотворения)	Стадии развития (по Gosner, 1960)
Зрелые ооциты	$N = 5, n = 10$		
Личинки до начала питания	$N = 11, n = 10$ $N = 6, n = 5$	12–25	21–25
Ранние природные головастики	$N = 3, n = 5$	32	26
Поздние природные головастики	$N = 10, n = 1$	79	27–32
Июльские метаморфы	$N = 10, n = 1$	82	42–45
Августовские метаморфы	$N = 8, n = 1$	120	42–45
Июльские сеголетки	$N = 14, n = 1$	82	46
Августовские сеголетки	$N = 5, n = 1$	120	46
Обрастания	$N = 3$		
Детрит	$N = 16$		
Личинки на кукурузной диете	$N = 15, n = 1$	70	26–35
Метаморфы на кукурузной диете	$N = 9, n = 1$	75–110	42–45
Кукурузная диета	$N = 5$		

N – количество образцов; n – количество ооцитов, отдельных головастиков, метаморфов или сеголетков в образце.

ни, обрастаний и детрита высушивали в течение трех суток при 60°C и перетирали в ступке. 500 мкг образца помещали в оловянные капсулы, завальцовывали и хранили в эксикаторе с силикагелем до момента анализа.

Изотопный состав углерода и азота в образцах определяли с помощью масс-спектрометра Thermo-Finnigan Delta V Plus, сопряженного с элементным анализатором (Thermo Flash 1112) и представляли как отклонение молярных отношений тяжелого и легкого изотопов элемента (R) в образце от соответствующего соотношения изотопов в принятых стандартах (VPDB – для углерода, атмосферный азот – для азота), выраженное в ‰:

$$\delta X_{\text{образец}} = \left(\frac{R_{\text{образец}}}{R_{\text{стандарт}}} - 1 \right) \times 1000.$$

Аналитическую точность прибора (0.20 и 0.10‰ (1 SD) для $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ соответственно) оценивали повторными калибровками внутреннего стандарта (референтные материалы МАГАТЭ). Параллельно в образцах определяли относительное содержание углерода и азота (C% и N%) и отношение этих величин (C/N).

Объем материала и статистический анализ данных

Численность и структура образцов, количество повторных измерений указаны в таблице. Результаты измерений анализировали и сравнивали с помощью непараметрических методов вариационной статистики (U -критерий Манна–Уитни и ран-

говая корреляция Спирмена) с использованием пакетов программ Stadia (А.П. Кулаичев, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова) и Statistica v. 6 (StatSoft). Параметры зрелых яиц остромордой лягушки (см. рис. 1) – фрагмент собственного, неопубликованного исследования.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Личинки до начала самостоятельного питания

Морфофункциональные изменения зародышей и ранних личинок амфибий в период эндогенного питания, очевидно, осуществляются без притока внешнего углерода и азота, обеспечены перераспределением углерода и азота в исходном (яйцевом, материнском) пуле веществ, но сопровождаются выведением этих элементов в составе конечных продуктов метаболизма. Увеличение доли тяжелого изотопа углерода в тканях в этот период (в среднем на 0.55‰, $P = 0.007$), вероятнее всего, связано с утилизацией желточных липидов. В пользу этого свидетельствует снижение C/N тканей личинок в сравнении с таковым яиц (хотя C% и N% в яйцах и личинках не различаются). Обогащение личинок тяжелым изотопом азота относительно зрелых яиц (на 1.19‰, $P = 0.038$, рис. 1) связано с ростом и увеличением разнообразия протеинов по мере развития зародышей и личинок. Эти процессы сопровождаются рециркуляцией аминокрупп, изотопным обеднением азота экскретируемых продуктов азотистого обмена и, соответственно, обогащением белков тяжелым стабильным изотопом азота (Minagawa, Wada, 1984; Macko, Estep, 1986; Wolf et al., 2009).

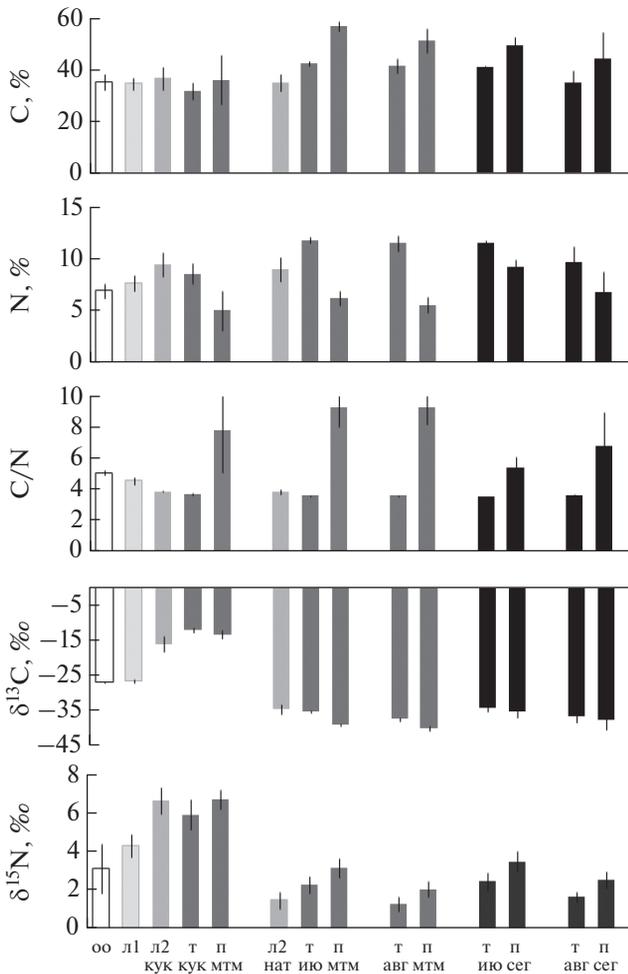


Рис. 1. Средние значения (\pm стандартные отклонения) относительного содержания углерода (C%), азота (N%), массового отношения C/N, изотопных отношений углерода ($\delta^{13}\text{C}$) и азота ($\delta^{15}\text{N}$) в тканях тела (т) и в печени (п) у зрелых ооцитов (oo), личинок до начала самостоятельного питания (л1), питающихся личинок (л2), июльских и августовских метаморфов (ию мтм, авг мтм) и сеголетков (ию сег, авг сег), росших на референтной диете (кук) и в естественной среде обитания (нат).

Самостоятельно питающиеся головастики

С началом самостоятельного питания в организм личинок поступают чужеродные, отличающиеся составом и изотопией углерода и азота, адсорбированные из пищи вещества. При этом, средние значения C% в тканях природных и содержавшихся на кукурузной диете головастиков не изменились в сравнении с таковыми в тканях непитавшихся личинок. Средние значения N% в тканях головастиков из обеих групп возросли ($P = 0.009$ и <0.001 соответственно), а средние значения C/N ожидаемо снизились ($P < 0.001$ в обоих случаях) в сравнении с соответствующими показателями непитавшихся личинок (см. рис. 1). Иными словами, в тканях питавшихся и росших

личинок, так же как в предшествующий период развития, продолжался рост относительного содержания белка.

Средние значения C% и N%, так же как значения C/N тканей питавшихся кукурузой и природных личинок не различались (рис. 1 и 2с). Наиболее существенное отличие этих групп головастиков состоит в том, что первые обогащались тяжелыми изотопами углерода и азота, в то время как вторые – легкими ($P < 0.000$ для всех сравнений соответствующих изотопных отношений; см. рис. 1 и 2). Изменение изотопного состава по мере роста личинок отражает выравнивание изотопного состава тканей и абсорбируемой пищи. Значения изотопного сдвига в тканях отдельных питавшихся кукурузой головастиков ($\Delta^{13}\text{C}_{\text{ткань-диета}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{ткани}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{диеты}}$) сократились от -7.30 до -1.04‰ по мере развития от 26-ой до 35-ой стадии (коэффициент ранговой корреляции Спирмена, $R = 0.816$, $P < 0.000$) и почти выровнялись с изотопным составом абсорбируемой пищи. Величины трофического сдвига ($\Delta^{15}\text{N}_{\text{ткань-диета}} = \delta^{15}\text{N}_{\text{ткани}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{диеты}}$) также значимо коррелируют с последовательностью стадий развития ($R = 0.684$, $P = 0.003$) и растут от 3.7‰ (у личинки на 26 стадии развития) до 5.8‰ (32–35 стадии развития) (см. рис. 2а, 2б). Эти значения превышают верхние пределы трофического сдвига (от 2.2 до 3.7‰), характерные для перехода пресноводных, аммонителических (Munro, 1953), растительных позвоночных на следующий трофический уровень (Vanderklift, Ponsard, 2003). Поскольку характер питания головастика, содержащегося на референтной диете, не изменялся, можно полагать, что высокие (и возрастающие по мере развития) значения $\Delta^{15}\text{N}$ связаны с интенсивным трансаминированием, сопровождающимся возрастающей экскрецией аммиака, обогащенного легким изотопом азота. Высокий уровень трансаминирования у растущих организмов неизбежен не только в связи с быстрым обновлением белков, но и с изменением качественного состава тканевых белков при развитии. Ситуации такого рода характерны для растущих организмов (см., например, Genner et al., 2003; Vander Zanden et al., 1998; Kelly, Martinez del Rio, 2010) и усугубляются при несоответствии абсорбируемых из пищи аминокислот с аминокислотным составом тканевых белков (см., например: Webb et al., 1998; Focken, 2001; Gaye-Siessegger et al., 2003; Robbins et al., 2005).

Рост и развитие природных личинок, в отличие от личинок на референтной диете, сопровождались обеднением тканей ^{13}C (рис. 1). $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ отрицательно коррелируют с последовательностью стадий развития (рис. 2d, 2e), ростом N% ($R = 0.667$, $P = 0.020$) на фоне неизменного C% и, соответственно, снижением C/N (рис. 2f). Этот тренд, вероятно, отражает замещение исходного

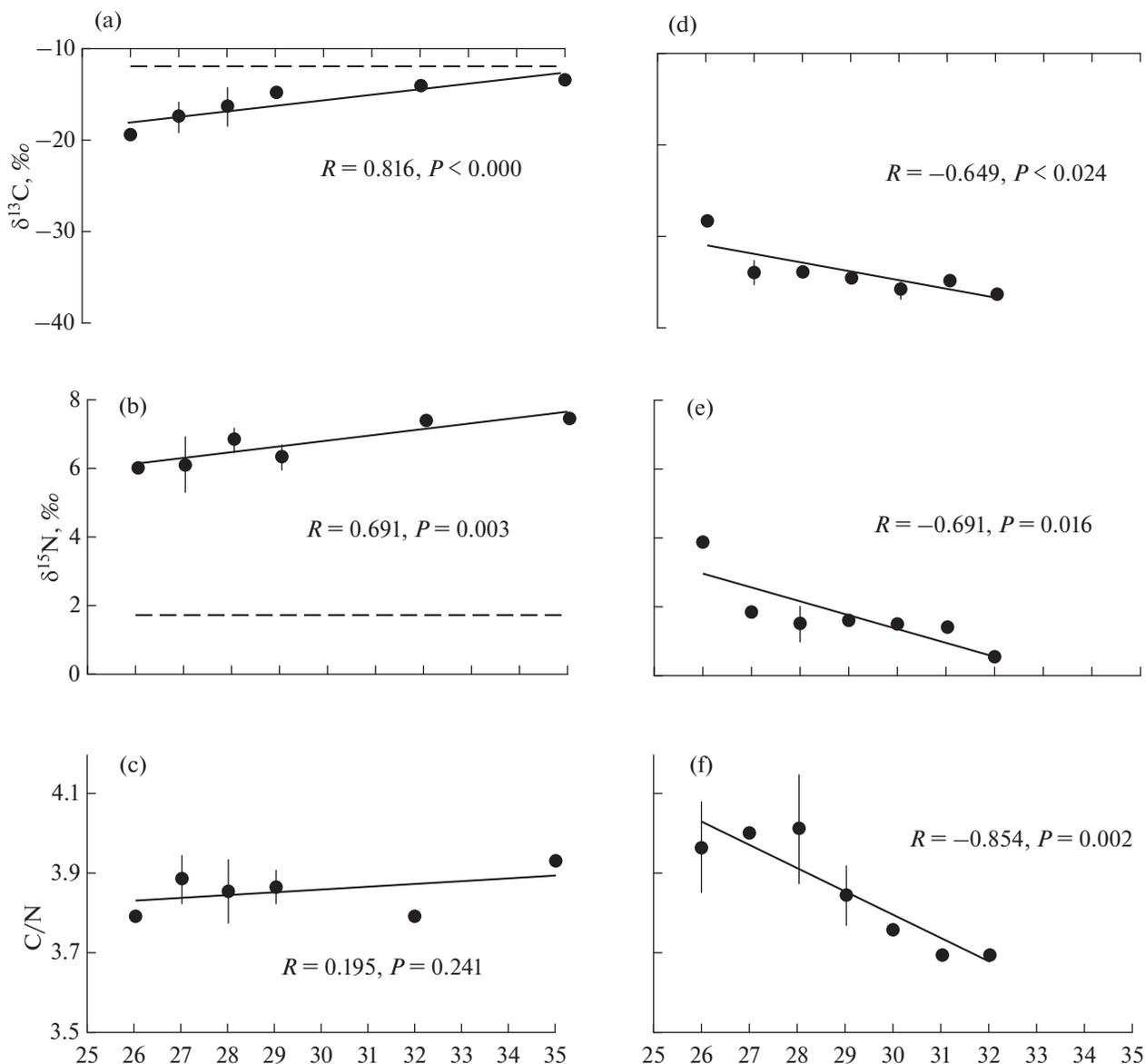


Рис. 2. Изменения изотопного отношения углерода (a, d) и азота (b, e) и отношения C/N (c, f) (средние значения \pm стандартные отклонения) по мере развития головастика остромордой лягушки, росших на референтной диете *in vitro* (a, b, c) и в естественных условиях обитания (d, e, f). Горизонтальная ось – стадии развития (по Gosner, 1960). В поле диаграмм представлены значения коэффициентов ранговой корреляции Спирмена и их значимость. Пунктирные линии – $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ кукурузной диеты.

изотопного состава ткани на изотопный состав ассимилируемой пищи. Однако источник и природа ассимилируемой природными головастиками пищи не очевидны.

В содержимом кишечника природных головастика представлен мелкодиспергированный детрит, в котором изредка встречаются зеленые водоросли. Водоросли не могли быть существенным компонентом рациона головастика, поскольку $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ образцов обрастаний несопоставимо выше, чем аналогичные показатели тканей головастика: $\delta^{13}\text{C} = -25.37 \pm 1.031\text{‰}$; $\delta^{15}\text{N} = 5.24 \pm$

$\pm 0.564\text{‰}$ (средние значения \pm стандартное отклонение). Показатели для цельного детрита ($\delta^{13}\text{C} = -30.81 \pm 0.634\text{‰}$; $\delta^{15}\text{N} = -0.96 \pm 0.909\text{‰}$) несколько ближе к таковым тканей головастика. $\Delta^{15}\text{N}_{\text{ткань-детрит}}$ равен в среднем 2.48‰ и снижается от 3.04 до 1.5‰ по мере развития от 27 до 32 стадии. Эти значения не превышают указанных выше верхних пределов трофического сдвига (Vanderklift, Ponsard, 2003). Иными словами, можно допустить, что головастики получают легкий изотоп азота из детрита. $\Delta^{13}\text{C}_{\text{ткань-детрит}}$, в среднем

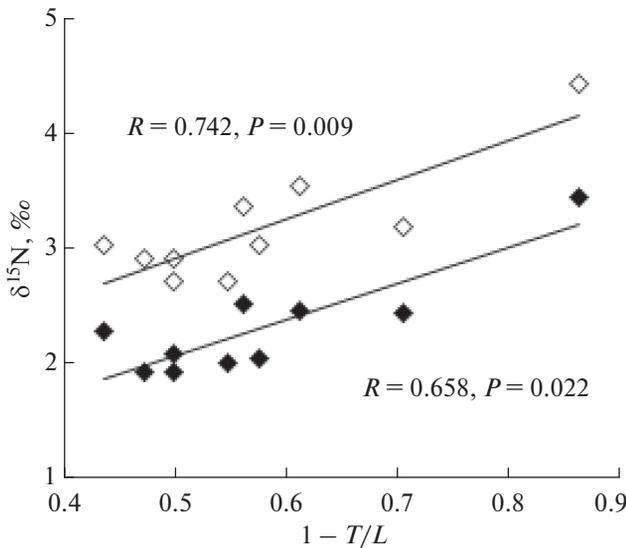


Рис. 3. Рост изотопного отношения азота в тканях тела (тонируемые маркеры) и в печени (открытые маркеры) метаморфов по мере редукции хвоста. Горизонтальная ось – увеличение относительной длины тела метаморфа (T – полная длина метаморфа, L – длина хвоста). В поле графика представлены значения и значимость коэффициентов ранговой корреляции Спирмена.

равный -3.86‰ , также снижается от -1.5‰ (стадия 27) до -5.6‰ (стадия 32).

Содержание белка и пищевая ценность цельного детрита варьируют от 1.9 до 5.8% и от 3.8 до 9.3 кДж/г (в пересчете на беззольный сухой вес) соответственно (Bowen, 1987), что, по мнению многочисленных авторов, недостаточно для нормального роста и развития детритофагов. Основная масса деградированного детрита представлена неусвояемыми целлюлозой, гемицеллюлозой и лигнином, а меньшую часть составляют бактерии (вероятнее всего, целлюлолитические) и продуцируемый ими органический матрикс (Decho, Lopez, 1993; Wotton, 2011), которые могут служить усвояемой головастиками пищей.

Опираясь на известные факты, можно предложить два сценария событий, приводящих к обеднению тканей детритофагов стабильным изотопом углерода. 1) В рацион детритофага попадают сильно обедненные ^{13}C метанотрофные бактерии (Kiyashko et al., 2001; Kohzu et al., 2004; Grey, 2016) и 2) рацион головастиков включает активно пролиферирующие гетеротрофные микроорганизмы, обедненные ^{13}C (в связи с пролиферативным статусом) (McGoldrick et al., 2008). В условиях азотистого дефицита снижение $\delta^{15}\text{N}$ (координированное со снижением $\delta^{13}\text{C}$) тканей детритофагов полагают результатом рециклирования азота: микроорганизмы, служащие пищей детритофагам, ассимилируют изотопно-легкий азот экскретированных детритофагами продуктов азотистого обмена; ас-

симилированный азот возвращается в ткани детритофагов из поглощенных микроорганизмов (Macko, Estep, 1984; Kiyashko et al., 2001; Ings et al., 2012; Grey, 2016).

Не исключено, что изотопный состав тканей головастиков в определенной мере “модулирован” специфическими особенностями их питания – пролиферацией симбиотической микрофлоры в задней кишке, стимулированной доступностью изотопно-легких продуктов азотистого обмена головастика, и поглощением извергнутого содержимого задней кишки. Существование симбиотической кишечной микробиоты у детритоядных головастиков хорошо известно (см. Altig et al., 2007); копрофагия является неременной особенностью головастиков и способствует их росту и развитию (Steinwascher, 1978; Waringer-Löschenkohl, Schagerl, 2001).

Метаморфический климакс

Перестройка ротового аппарата и деградация кишечника делает невозможным самостоятельное питание метаморфов в период метаморфического климакса. Между тем, отсутствие экзогенного питания для них не драматично. Массированный распад личиночных тканей и органов “наводняет” организм полноценным набором органических веществ, которых достаточно и для основного обмена, и для анаболических процессов при реконструкции органов и тканей лягушки, и для создания резерва питательных веществ. Относительное содержание углерода и азота значительно возрастает в тканях туловища июльских и августовских природных метаморфов в сравнении с тканями личинок ($P < 0.001$). При этом C/N не на много, но статистически значимо снижается ($P < 0.001$) (см. рис. 1). Эти изменения в совокупности свидетельствуют об обогащении тканей туловища белками; или, иными словами, о продолжающейся реконструкции личиночных органов и росте органов наземной формы организма. Изотопный состав углерода в тканях туловища значимо не изменяется.

Печень июльских и августовских природных метаморфов обогащается углеродом, но обедняется азотом в сравнении с тканями туловища ($P < 0.001$ для всех сравнений). Соответственно, отношения C/N образцов печени значительно превышают таковые для тканей туловища ($P < 0.001$), что, в сочетании с обеднением ткани печени легким изотопом углерода (рис. 1), указывает на интенсивное накопление резервных липидов в органе. Ткани туловища и, в еще большей мере, печень обогащены ^{15}N в сравнении с тканями личинок ($P < 0.001$). Укорочение хвоста положительно коррелирует с ростом $\delta^{15}\text{N}$ как в тканях туловища, так и в печени (рис. 3). В совокупности, эти изме-

нения свидетельствуют о становлении уротелического типа азотистого обмена у метаморфов.

Июльские и августовские метаморфы не отличаются по элементному составу тканей туловища, но значения С% и N% в печени августовских метаморфов несколько ниже, чем у июльских ($P = 0.016$ и 0.043 соответственно). Ткани августовских метаморфов (включая печень) обеднены тяжелыми изотопами углерода и азота ($P < 0.001$) в сравнении с тканями лидирующих (июльских) метаморфов (рис. 1). Возможно, что в течение более продолжительного периода личиночного развития изотопный состав тканей августовских метаморфов полностью уравнился с изотопным составом ассимилируемой пищи; либо на протяжении этого периода изменялся изотопный состав пищи.

Изменения в тканях выросших на кукурузной диете метаморфов в период климакса принципиально подобны таковым у природных метаморфов. Для печени (в сравнении с тканями туловища) характерно более низкое значение N% и более высокое значение C/N ($P < 0.001$), что, в совокупности со снижением $\delta^{13}\text{C}$ ($P = 0.011$) (рис. 1), свидетельствует о синтезе и накоплении жиров в органе. Обогащение печени (в сравнении с тканями туловища) тяжелым изотопом азота ($P = 0.038$) указывает на осуществление орнитинового цикла.

Сеголетки

Переход на наземное существование сопряжен с кардинально иным способом передвижения, легочным (помимо кожного) дыханием и активным пищедобыванием у сеголетков. Возрастание энергетических затрат наземных сеголетков (в сравнении с головастиками и метаморфами) немедленно отражается на элементном и изотопном составе. Так, убыль содержания углерода в тканях туловища июльских и августовских сеголетков (в сравнении с метаморфами, $P < 0.001$), не сопровождающаяся изменениями N%, вероятнее всего, связана с расходом гликогена мышц. Убыль С% ($P < 0.001$) и рост N% ($P < 0.001$), приводящие к снижению C/N ($P < 0.001$) и сопровождающиеся возрастанием $\delta^{13}\text{C}$ в печени (рис. 1), определенно отражают интенсивное окисление липидов, обеспечивающее энергетические траты сеголетков. Значения $\delta^{15}\text{N}$ в тканях туловища и печени у одновозрастных сеголетков и метаморфов одинаковы. Ткани августовских сеголетков, так же как в случае с метаморфами, обеднены ^{13}C и ^{15}N (в сравнении с июльскими).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленный выше материал — попытка применения широко используемой в экологи-

ческих исследованиях методологии к анализу растущего и развивающегося организма. Полученный результат оказался, как минимум, не менее успешным, чем в приложении к анализу экосистем. Так, при отсутствии внешнего питания в развивающейся системе (организме) происходит перераспределение в пользу азотсодержащих органических веществ. Собственно перераспределение предполагает расход углеводов и жиров, обеспечивающих пластические и энергетические потребности в процессе обновления и расширения спектра синтезируемых белков. Избыточное количество превращающихся веществ (например, в период массивного распада тканей при метаморфозе) резервируется в форме жиров и, вероятно, гликогена. Поступление в организм ассимилированных из пищи веществ стимулирует бурный рост и опережающее накопление белков и, в еще большей мере, усиливает их оборот и обновление.

Перечисленные выше процессы хорошо известны, либо домысливаются на основании общих представлений о биохимических превращениях. Однако их отражение в элементном и изотопном составе отличается, как минимум, двумя существенными особенностями: 1) интегративностью, обеспеченной фундаментальностью показателей превращающегося вещества (т.е. биогенных элементов и их стабильных изотопных форм) и 2) возможностью количественных оценок превращения и распределения веществ на всем протяжении онтогенеза. Информативность обсуждаемой методологии может существенно возрасти при расширении спектра анализируемых образцов (тканей, закладок, органов) и состава регистрируемых биогенных элементов (прежде всего водорода и кислорода).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бучаченко А.Л. Новая изотопия в химии и биохимии. М.: Наука, 2007. 189 с.
- Altig R., Whiles M.R., Taylor C.L. What do tadpoles really eat? Assessing the trophic status of an understudied and imperiled group of consumers in freshwater habitats // *Freshwater Biol.* 2007. V. 52. P. 386–395.
- Blair N., Leu A., Nunoz E. et al. Carbon isotopic fractionation in heterotrophic microbial metabolism // *Appl. Environ. Microbiol.* 1985. V. 50. P. 996–1001.
- Bowen S.H. Composition and nutritional value of detritus. In: Moriarty D.J.W. and Pullin R.S.V. (eds.). *Detritus and microbial ecology in aquaculture. ICLARM Conference Proceedings 14. International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines, 1987. P. 192–216.*
- Caut S., Angulo E., Diaz-Paniagua C. et al. Plastic changes in tadpole trophic ecology revealed by stable isotope analysis // *Oecologia.* 2013. V. 173. P. 95–105.
- Decho A.W., Lopez G.R. Exopolymer microenvironments of microbial flora: Multiple and interactive effects on tro-

- phic relationships // *Limnol. Oceanog.* 1993. V. 38. № 8. P. 1633–1645.
- DeNiro M.J., Epstein S.* Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals // *Geochim. Cosmochim. Acta.* 1978. V. 42. P. 495–506.
- DeNiro M.J., Epstein S.* Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals // *Geochim. Cosmochim. Acta.* 1981. V. 45. P. 341–351.
- Doi H., Kikuchi E., Takagi S. et al.* Changes in carbon and nitrogen stable isotopes of chironomid larvae during growth, starvation and metamorphosis // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007. V. 21. № 6. P. 997–1002.
- Doronin Yu.K., Bednik D.Yu., Ivanov A.A. et al.* Maternal-fetal interaction: An insight through the stable isotope fractionation prism // *Brit. J. Med. Med. Res.* 2012. V. 2. № 4. P. 701–714.
- Focken U.* Stable isotopes in animal ecology: The effect of ration size on the trophic shift of C and N isotopes between feed and carcass // *Isotopes in Environ. Health Stud.* 2001. V. 37. № 3. P. 199–211.
- Fry B., Arnold C.* Rapid $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ turnover during growth of brown shrimp (*Penaeus aztecus*) // *Oecologia.* 1982. V. 54. P. 200–204.
- Galimov E.M.* Biological fractionation of isotopes. N.Y., Acad. Press, 1985. 261 p.
- Gannes L.Z., O'Brien D.O., Martinez del Rio C.* Stable isotopes in animal ecology: assumptions, caveats, and a call for more laboratory experiments // *Ecology.* 1997. V. 78. № 4. P. 1271–1276.
- Genner M.J., Hawkins S.J., Turner G.F.* Isotopic change throughout the life history of a Lake Malawi cichlid fish // *J. Fish Biol.* 2003. V. 62. P. 907–917.
- Gosner K.L.* A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification // *Herpetologica.* 1960. V. 16. P. 183–190.
- Grey J.* The incredible lightness of being methane-fuelled: Stable isotopes reveal alternative energy pathways in aquatic ecosystems and beyond // *Front. Ecol. Evol.* 2016. V. 4. Article 8. doi 10.3389/fevo.2016.00008
- Ings N.L., Hildrew A.G., Grey J.* “House and garden”: Larval galleries enhance resource availability for a sedentary caddisfly // *Freshwater Biol.* 2012. V. 57. P. 2526–2538.
- Gaye-Siessegger J., Focken U., Abel H.-J. et al.* Feeding level and diet quality influence trophic shift of C and N isotopes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* (L.)) // *Isotopes in Environ. Health Stud.* 2003. V. 39. № 2. P. 125–134.
- Jefferson D.M., Russell R.W.* Ontogenetic and fertilizer effects on stable isotopes in the green frog (*Rana clamitans*) // *Appl. Herpetol.* 2008. V. 5. № 2. P. 189–198.
- Kelly L.J., Martinez del Rio C.* The fate of carbon in growing fish: An experimental study of isotopic routing // *Physiol. Biochem. Zool.* 2010. V. 83. № 3. P. 473–480.
- Kiyashko S.I., Narita T., Wada E.* Contribution of methanotrophs to freshwater macroinvertebrates: Evidence from stable isotope ratios // *Aquat. Microb. Ecol.* 2001. V. 24. P. 203–207.
- Kohzu A., Kato C., Iwata T. et al.* Stream food web fueled by methane-derived carbon // *Aquat. Microb. Ecol.* 2004. V. 36. P. 189–194.
- Kupfer A., Langel R., Scheu S. et al.* Trophic ecology of a tropical aquatic and terrestrial food web: Insights from stable isotopes (^{15}N) // *J. Tropical Ecol.* 2006. V. 22. № 4. P. 469–476.
- Love A.C.* Idealization in evolutionary developmental investigation: a tension between phenotypic plasticity and normal stages // *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2010. V. 365. P. 679–690.
- Macko S.A., Estep M.L.F.* Microbial alteration of stable nitrogen and carbon isotopic compositions of organic matter // *Org. Geochem.* 1984. V. 6. P. 787–790.
- McGoldrick D.J., Barton D.R., Power M. et al.* Dynamics of bacteria–substrate stable isotope separation: Dependence on substrate availability and implications for aquatic food web studies // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 2008. V. 65. P. 1983–1990.
- Minagawa M., Wada E.* Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: Further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age // *Geochim. Cosmochim. Acta.* 1984. V. 48. P. 1135–1140.
- Munro A.F.* The ammonia and urea excretion of different species of Amphibia during their development and metamorphosis // *Biochem. J.* 1953. V. 54. № 1. P. 29–36.
- Peterson B.J., Fry B.* Stable isotopes in ecosystem studies // *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 1987. V. 18. P. 293–320.
- Robbins C.T., Felicetti L.A., Sponheimer M.* The effect of dietary protein quality on nitrogen isotope discrimination in mammals and birds // *Oecologia.* 2005. V. 144. № 4. P. 534–540.
- Schiesari L., Werner E.E., Kling G.W.* Carnivory and resource-based niche differentiation in anuran larvae: Implications for food web and experimental ecology // *Freshwater Biol.* 2009. V. 54. P. 572–586.
- Schriever T.A., Williams D.D.* Influence of pond hydroperiod, size, and community richness on food-chain length // *Freshwater Sci.* 2013. V. 32. № 3. P. 964–975.
- Steinwascher K.* The effect of coprophagy on the growth of *Rana catesbeiana* tadpoles // *Copea.* 1978. № 1. P. 130–134.
- Tibbets T.M., Wheeless L.A., Martinez del Rio C.* Isotopic enrichment without change in diet: An ontogenetic shift in $\delta^{15}\text{N}$ during insect metamorphosis // *Funct. Ecol.* 2008. V. 22. P. 109–113.
- Tieszen L.L., Boutton T.W., Tesdahl K.G. et al.* Fractionation and turnover in animal tissue: implication for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of diet // *Oecologia.* 1983. V. 57. P. 32–37.
- Schriever T.A., Williams D.D.* Ontogenetic and individual diet variation in amphibian larvae across an environmental gradient // *Freshwater Biol.* 2013. V. 58. P. 223–236.
- Trakimas G., Jardine T.D., Bariseviciute R. et al.* Ontogenetic dietary shifts in European common frog (*Rana temporaria*) revealed by stable isotopes // *Hydrobiologia.* 2011. V. 675. P. 87–95.
- Vander Zanden M.J., Hulshof M., Ridgway M.S. et al.* Application of stable isotope techniques to trophic studies of Age-0 smallmouth bass // *Transact. Am. Fish. Soc.* 1998. V. 127. P. 729–739.
- Vanderklift M.A., Ponsard S.* Sources of variation in consumer-diet $\delta^{15}\text{N}$ enrichment: A meta-analysis // *Oecologia.* 2003. V. 136. № 2. P. 169–182.
- Verburg P., Kilham S.S., Pringle C.M. et al.* A stable isotope study of a neotropical stream food web prior to the extir-

- pation of its large amphibian community // *J. Tropical Ecol.* 2007. V. 23. № 6. P. 643–651.
- Waringer-Löschenkohl A., Schagerl M. Algal exploitation by tadpoles – an experimental approach // *Intern. Rev. Hydrobiol.* 2001. V. 86. № 1. P. 105–125.
- Webb S.C., Hedges R.E.M., Simpson S.J. Diet quality influences the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of locusts and their biochemical components // *J. Exp. Biol.* 1998. V. 201. P. 2903–2911.
- Wolf N., Carleton S.A., Martínez del Río C. Ten years of experimental animal isotopic ecology // *Funct. Ecol.* 2009. V. 23. P. 17–26.
- Wotton R.S. EPS (Extracellular Polymeric Substances), silk, and chitin: vitally important exudates in aquatic ecosystems // *J. N. Am. Benthol. Soc.* 2011. V. 30. № 3. P. 762–769.

Changes in Elemental and Isotopic Composition Accompanying Larval Growth and Metamorphosis of the Moor Frog

Yu. K. Doronin^{a, *}, A. V. Tiunov^b, and E. N. Kalistratova^a

^aMoscow State University, Moscow, 199991 Russia

^bSevertsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: ljh_rjycn@mail.ru

Received August 29, 2016

A variety of early ontogenetic events of anuran species (growth, structural and biochemical diversification, metamorphosis) offers a unique opportunity to evaluate the effectiveness and application limits of mass spectrometry method for the analysis of metabolic and transformation events in developing organisms. The dynamics of relative carbon and nitrogen contents and stable isotopes of these elements during larval development in the period of metamorphosis climax and after its conclusion in moor frog specimens developing in their natural habitat and in vitro on a referent diet are traced. A decrease in C/N ratio and enrichment of the tissues with heavy stable isotopes of carbon and nitrogen during embryonal and larval development (prior to the beginning of independent feeding) indicates the increase in the portion and variety of proteins, accompanied by consumption of yolk lipids. The relative nitrogen content increase and C/N ratio decreases with the growth and development of independently feeding tadpoles, which indicates surpassing increase of the portion of proteins in tissues. In growing tadpoles, the rates of tissue renewal in general and rates of protein metabolism in particular affect the kinetics of changes of tissue isotope composition, which approaches isotope composition of the consumed food. A decrease in C/N ratio in the bodies of metamorphs during mass tissue decomposition is indicative of continuing reconstruction of larval organs and growth of anlage of definitive organs. Significant increase of C/N ratio and depletion of liver samples by heavy carbon isotopes are associated with intensive synthesis and reservation of lipids within the organ. Strong enrichment of metamorphs' tissues with heavy nitrogen isotope indicates the substitution of ammoniotelic type of nitrogen metabolism by urotelic type. Decrease in C/N ratio and enrichment of tissues by heavy carbon isotope may be connected to intensive oxidation of lipids, which supports the growing energy costs of terrestrial underyearlings. Relative contents of heavy nitrogen isotope in the tissues of underyearlings does not change compared to the tissues of metamorphs.

Keywords: Anura, larval development, metamorphosis, stable isotopes, carbon, nitrogen