

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ ИМ. А. О. КОВАЛЕВСКОГО

ISSN 0203-4646

ЭКОЛОГИЯ МОРЕЯ



35

1990

ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗДРАЖИМОСТИ КОПЕПОД ПО ИХ ДВИГАТЕЛЬНОЙ И БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ РЕАКЦИИ

Исследовали показатели раздражимости (реобазис, хронаксия, аккомодация и др.) по двигательной реакции копепод и возникновению биолюминесцентного ответа. Показано, что биолюминесцентная система является достаточно автономным элементом, характеризующимся высокой динамичностью, функциональной подвижностью, отличными от тех, которые характерны для обыкновенных двигательных реакций. Характерные черты возникновения и проведения возбуждения, обеспечивающего реакцию свечения, свидетельствуют о специализированном статусе такой системы, специфичность которой отражает результат эволюционных преобразований.

Свечение моря обязано существованию многочисленных, как правило, мелких, организмов из состава планктона, способных генерировать световую энергию. За исключением бактерий основная масса биолюминесцентных Мирового океана излучает свет лишь в ответ на внешнее раздражение [9], хотя у более высокоорганизованных форм из числа головоногих моллюсков, рыб внешняя мотивация светоизлучения в определенной мере трансформируется посредством центральной нервной системы [1]. Однако для большинства планктонных организмов — излучателей света — возбудимость является свойством, определяющим появление световой вспышки. Способность реагировать на внешнее раздражение вообще как характерный признак живого вещества в данном случае определяет появление или отсутствие светового сигнала. Источником внешних раздражений в природе могут быть тактильные взаимодействия с особями своего вида при возрастании плотности популяции, взаимодействия типа хищник — жертва, миграции более крупных организмов, волнение моря и др. Выделение из всего спектра раздражителей тех, которые по степени и времени своего воздействия вызывают конкретную физиологическую реакцию, в данном случае биолюминесцентную, представляется важным для понимания как биологической роли биолюминесценции исследуемых групп организмов, так и иерархической структуры взаимодействий *in situ*, характерных для исследуемых видов.

В данной работе рассматривается раздражимость нескольких видов планктонных веслоногих раков (Copepoda), относящихся, с одной стороны, к характерным компонентам морских экосистем, с другой — к одним из массовых биолюминесцентных Мирового океана.

Материал и методика. Материалом для исследований служили веслоногие ракообразные родов *Pleuromamma*, *Lucicutia*, *Heterorhabdus*, *Opsaea* из состава планктона Атлантического океана и Средиземного моря. Эксперименты проведены в период 2-го рейса НИС «Профессор Водяницкий», 34-го рейса НИС «Академик Вернадский» в тропическую Атлантику (1977 и 1986 гг.) и 96-го рейса НИС «Академик Ковалевский» в Средиземное море (1985 г.).

Установка для регистрации биолюминесценции и формирования дозированного раздражения описана в [2, 4]. Минимальный гальванический порог раздражения определяли по появлению светового сигнала, регистрируемого фотоэлектронным умножителем достаточно высокой чувствительности. Таким образом оценивали параметры раздражи-

Основные характеристики раздражимости разных видов веслоногих ракообразных по данным их двигательной реакции и биолюминесценции

Вид	Биолюминесценция						Двигательная реакция					
	Реобазы, мА·мм ⁻²			Хронаксия, м·с			Реобазы, мА·мм ⁻²			Хронаксия, м·с		
	n	$\bar{x}$	δ	n	$\bar{x}$	δ	n	$\bar{x}$	δ	n	$\bar{x}$	δ
<i>Pleuromamma gracilis</i>	33	0,29	0,21	23	0,65	0,61	13	0,24	0,17	4	0,48	0,04
<i>P. abdominalis</i>	32	0,41	0,26	22	0,56	0,29	7	0,19	0,09	5	0,92	0,05
<i>Heterorhabdus papilliger</i>	7	0,82	0,14	5	0,92	0,35	6	0,60	0,21	6	0,38	0,11
<i>Lucicutia flavicornis</i>	28	1,04	0,31	18	0,87	1,02	5	0,39	0,17	4	0,83	0,33
<i>Oncaea conifera</i>	2	0,68	—	2	0,95	—	3	0,38	—	3	0,70	—

мости структур, ответственных за экскрецию светового субстрата и фермента в окружающую среду. Как известно, обычно применяемая в физиологических исследованиях методика количественной оценки возбудимости в качестве ответной реакции исследует либо механический эффект (сокращение мышц), либо появление бегущей волны возбуждения (для нервных и мышечных волокон) [7]. С целью сопоставления результатов применяемой нами методики оценки раздражимости на основе биолюминесценции и традиционных методов ее изучения проводили пороговое раздражение копепод в тех же электрических кюветах под бинокулярным микроскопом МБС-2 при умеренном освещении, оценивая появление возбуждения (порог) по возникновению синхронного с подаваемыми импульсами тока движения конечностей — антеннул, плеопод.

Проведение экспериментов с веслоногими раками начиналось не менее чем через 1 ч после взятия ловов. Последние осуществлялись с помощью сети Джели с глубин 150—200 м при скорости выборки троса 0,3—0,4 м·с⁻¹. Полученный таким образом материал отстаивался в течение 20—30 мин в темном месте для освобождения от травмированных форм. Затем указанные виды копепод пересаживались в боксы с фильтрованной водой, где находились до начала экспериментов.

Результаты и обсуждение. В качестве основных параметров раздражимости у исследованных видов оценивали реобазу, или минимальный гальванический порог (плотность тока), вызывающий световую вспышку, либо мышечную реакцию конечностей, и хронаксию, равную пороговому времени действия стимула при его силе в две реобазы. Несмотря на ряд недостатков хронаксиметрии [7], сравнительный анализ хронаксии, установленный при одинаковых условиях и постоянном межэлектродном расстоянии, представляется информативным.

В таблице приведены данные хронаксии и реобазы, полученные на основе регистрации двигательной и биолюминесцентной реакции копепод. Отсюда следует, что значения реобазы для разных видов близки, хотя для видов рода *Pleuromamma* они ниже. У ранее исследованной копеподы *P. piseki* реобазы также близка к отмеченным для *P. abdominalis* и *P. gracilis*, составляя 0,22 мА·мм⁻² [4]. Отличие от других видов при этом достоверно. Например, для *P. gracilis* и *H. papilliger* при единообразии дисперсий средние значительно различаются в 2,1 раза (по критерию Стьюдента ($t_{\text{эксп}}=5,166 > t_{\text{табл}}=2,02$)). Соответственно для *P. gracilis* и *L. flavicornis* различие средних также подтверждается статистически ($t_{\text{эксп}}=9,42 > t_{\text{табл}}=2,00$). Иными словами, степень возбудимости видов рода *Pleuromamma* выше, чем у остальных исследованных копепод. По данным регистрации двигательных реакций тенденция аналогична — наиболее низкие величины реобазы отмечены у *Pleuromamma* (см. таблицу). Значения хронаксии более близки у разных видов, а также мало зависят от способов ее регистрации.

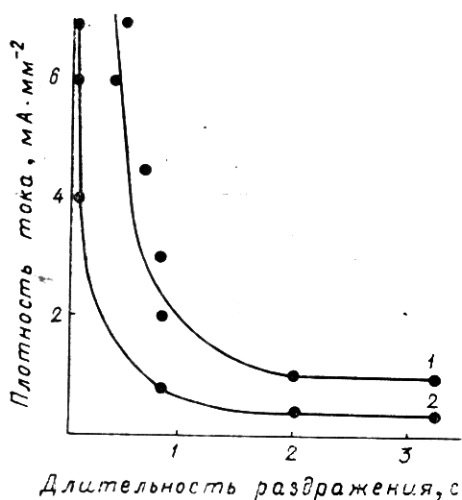


Рис. 1. Зависимость пороговой плотности тока от времени его действия по данным биолуминесцентной (1) и двигательной (2) реакции *Lucicutia flavicornis*

жении действия тока на возбудимую ткань возрастает значение времени воздействия. Зависимость величины порогового тока от времени его воздействия определяется выражением [6]:

$$i = \frac{a}{t_n} + b, \quad (1)$$

где i — сила тока; t — время его действия; a , b — константы; n — показатель степени. На рис. 1 рассмотрены зависимости плотности тока от времени его действия по данным биолуминесцентной и двигательной реакций. Графики представляют собой гиперболы, правая часть которых идет параллельно оси абсцисс, отстоя от нее на величину реобазы b , а левая асимптотически приближается к оси ординат. Из рис. 1 видны различия в ходе кривых сила — длительность, полученных на основе регистрации биолуминесцентной реакции и движения. Д. Н. Насонов [7] установил, что в области коротких интервалов времени можно выделить еще один информативный показатель — фактор крутизны, не зависящий от абсолютных значений реобазы и хронаксии. Так, при достаточно коротких воздействиях тока на объект соотношение $\frac{a}{t}$ превращается в такую большую величину, что b можно пренебречь. Тогда имеем

$$i = \frac{a}{t}, \quad (2)$$

при логарифмировании получаем

$$\lg i = \lg a - \lg t. \quad (3)$$

Графически зависимость будет выглядеть в виде прямой, направленной под определенным углом к оси абсцисс. Обработанные таким образом данные для видов *L. flavicornis* и *H. rapilliger* представлены на рис. 2. Из графиков видно, что прямые отсекают неравные отрезки на осях координат, что свидетельствует о необходимости введения поправочного коэффициента n , соответствующего тангенсу образуемого при пересечении оси абсцисс угла. В таком случае формула зависимости порога от i и t более корректно выглядит как

$$\lg i = \lg a - n \lg t. \quad (4)$$

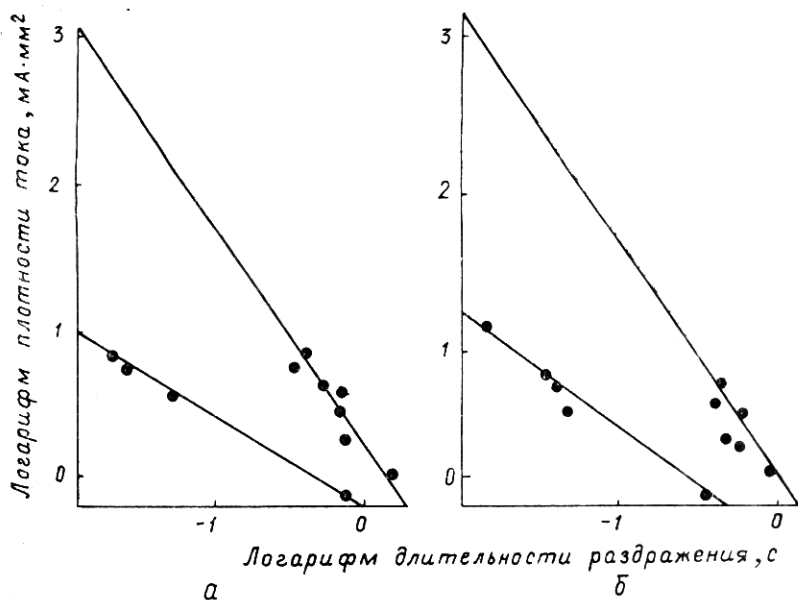


Рис. 2. Логарифмированные кривые «сила — длительность» для биOLUMИНЕСЦЕНТНОЙ (1) и двигательной (2) реакции *Lucicutia flavicornis* (а) и *Heterorhabdus papilliger* (б).

Поэтому в первоначальном выражении (1) фигурирует показатель степени n или «фактор крутизны» [7], т. е. n выражает в формуле (1) крутизну нарастания пороговой силы тока при уменьшении времени его действия. По [7] указанный наклон асимптоты может меняться от 0,5 до 1,0, в зависимости от вида тканей и организмов.

Как видно из рис. 2, наклоны асимптот, полученных по данным биOLUMИНЕСЦЕНЦИИ и движения, различны. Фактор крутизны, установленный на основании двигательных реакций для *L. flavicornis* и *H. papilliger*, соответственно равен 0,58 и 0,66, что находится в пределах его изменения и характерно для некоторых тканей позвоночных [6]. По данным биOLUMИНЕСЦЕНТНОЙ реакции, фактор крутизны оказался выше (соответственно 1,42 и 1,35), превышая в два с лишним раза его значения для двигательных реакций. Подобное несоответствие значений крутизны кривой сила — длительность отмечено для биOLUMИНЕСЦЕНТНОЙ реакции более простых форм [2]. В частности, для перидиней *Noctiluca miliaris* данный показатель соответствовал 0,33, что ниже указанного [7] предела изменения n .

Таким образом, в области коротких длительностей воздействия тока на биOLUMИНЕСЦЕНТНУЮ систему копекод отмечается меньшая чувствительность системы экскреции светового субстрата к изменению плотности тока по сравнению с реакцией на такое же изменение мышечной системы конечностей. В естественных условиях при тактильных взаимодействиях, имеющих стохастический характер, существенное значение для генерации биOLUMИНЕСЦЕНТНОЙ вспышки имеет время контакта: при относительно коротких взаимодействиях, например столкновениях, вспышка света появляется лишь при достаточно сильном взаимодействии. В первом приближении можно разделить такие взаимодействия на субмаксимальные, приводящие к генерации световых вспышек, и межпороговые, вызывающие лишь двигательные реакции. Различие в их интенсивности, по нашим данным, составляет b , где b — реобазис, определенная по мышечной реакции.

Иллюстрацией подобного распада внешних стимулов на две функционально разные группы являются, например, эксперименты Ж. Кларка с сотр. [8], в которых показано, что спонтанная биOLUMИНЕСЦЕНТНАЯ активность светящихся копекод из рода *Metridia* при отсутствии

хищника, но наличии естественных контактов со стенками экспериментальных сосудов или между особями, практически отсутствует. При наличии в эксперименте хищных амфипод, эуфаузиид, атакующих указанных копеподы, внешние стимулы по своей интенсивности становятся субмаксимальными, вызывая биolumинесцентные сигналы.

Рассмотрим, насколько сравнимы световые сигналы, генерируемые в области коротких, но сильных взаимодействий, и в области слабых длительных стимулов (реобазы). При анализе вспышек мы учитывали величины общей продолжительности свечения, их амплитуды, средней интенсивности и интегральной энергии [3].

Длительность световых вспышек, генерируемых организмами при определении пороговой величины раздражения в области длительного действия тока (реобазы), всегда выше таковой вспышек, получаемых в ответ на более интенсивные, но короткие раздражения. Энергетические характеристики существенно ниже у пороговых вспышек, вызываемых короткими сильными стимулами. Различия с сигналами, генерируемыми при определении реобазы, составляют для интенсивности, амплитуды и интегральной энергии соответственно 4; 7 и 10 раз. При определении пороговых величин светоизлучения в области коротких раздражений эти различия возрастают. Корреляционный анализ величин порогового тока и параметров светоизлучения показал преобладание отрицательных зависимостей не ниже 0,7, т. е. увеличение плотности тока в раздражающем импульсе при одновременном сокращении его действия вызывало уменьшение продолжительности и энергии светоизлучения. Согласно [5], возрастание силы раздражения при неизменной его длительности вызывает достаточно резкое увеличение отклика биolumинесцентной системы. В данном случае уменьшение длительности раздражения, видимо, оказывает более существенное влияние на параметры пороговых сигналов даже при значительном возрастании силы стимуляции. Этот вывод подчеркивает отмеченную выше тенденцию возрастания факторов крутизны n у биolumинесцентных систем копепод по сравнению с его значениями в двигательных реакциях. Иными словами, биolumинесцентная система веслоногих раков в большей мере управляется временными характеристиками внешних стимулов после достижения ими пороговых величин интенсивности.

При многократном раздражении светящихся копепод субмаксимальными величинами плотности тока через определенное время способность к светоизлучению исчезает. Отсутствие вспышек в этом случае объясняется не исчерпанием секрета, который продолжает флуоресцировать под УФ-облучением, а наступлением рефрактерного периода. Через определенное время способность ткани к ответной реакции полностью восстанавливается. На протяжении этого периода значения реобазы существенно возрастают. Так, первоначальные измерения минимального гальванического порога у *P. gracilis* составили $0,39 \text{ мА} \cdot \text{мм}^{-2}$, а после последующего многократного раздражения его значения достигали $3,4 \text{ мА} \cdot \text{мм}^{-2}$ при средней величине около $1,0 \text{ мА} \times \text{мм}^{-2}$. Высокие показатели в порогах раздражимости у *P. gracilis*, других биolumинесцирующих форм свидетельствуют о заторможенном состоянии ответственных за генерацию света структур. На основе такого вывода было предложено, например, оценивать физиологическое состояние организма по параметрам раздражимости [2].

Регистрация раздражимости организмов по биolumинесцентной реакции у интактных организмов, например планктонных, имеет ряд преимуществ по сравнению с аналогичной методикой регистрации их двигательных реакций. Одним из таких преимуществ является отсутствие необходимости фиксировать организм, а также возможность исследовать мелкие и малоактивные виды животных или растений. Однако, помимо самой величины порога, регистрируемая при этом вспышка также несет информационную нагрузку. Множественный корреляционный анализ матрицы, элементами которой являлись параметры раздра-

жимости, установленные по биолюминесцентной реакции, параметры самих пороговых вспышек, а также характеристики последующего светоизлучения при стимуляции током показал следующее.

Коэффициент корреляции значений длительности, амплитуды интегральной энергии пороговых вспышек с параметрами последующего светоизлучения, его временными и энергетическими характеристиками составляет 0,8—0,9. Т. е. в случае интенсивной и энергетически емкой пороговой вспышки последующее светоизлучение будет также отличаться высокой амплитудой, длительностью и энергией. Между пороговой величиной тока, вызывающего светоизлучение у копепода, и фиксированной при этом вспышкой имеется достаточно выраженная обратная связь ($r = -0,5$).

Исследование раздражимости по параметрам биолюминесцентной реакции позволяет также показать зависимость ее характеристик от градиента раздражения. При стандартных исследованиях реобазы и хронаксии стимуляция производится прямоугольными импульсами тока с практически мгновенным нарастанием напряжения на электродах до максимальной величины. Известно, что стимул, достигающий своей силы мгновенно, оказывает большее физиологическое действие, чем в случае постепенного его нарастания [6]. В экспериментах с *L. flavicornis* и *H. rapilliger* показано, что в зависимости от градиента нарастания раздражения снижается его эффективность, т. е. наблюдается явление аккомодации. Из рис. 3, а, б видно, что оба вида различаются по отношению к градиенту стимула. У *L. flavicornis* зависимость возникновения светоизлучения от времени нарастания силы раздражения до пороговой величины выражена слабее. В обоих случаях указанная зависимость является параболической. По данным [6], такой вид кривых характерен для нервных и скелетных тканей позвоночных. Константы аккомодации α , или пороговое время роста раздражения при его силе, в два раза превышающей пороговую силу мгновенно нарастающего стимула, также в обоих случаях оказались высокими. Для *P. abdominalis* и *L. flavicornis* они соответственно равны 400 и 1500 м·с, что ниже по абсолютным величинам приводимых характеристик для нервов ракообразных [6]. Физиологический смысл этих величин, в определенной мере характеризующих степень кривизны кривых (рис. 3, а, б), заключается в констатации значимости скорости нарастания стимула для данной реакции (биолюминесценции), т. е. при увеличении времени нарастания стимула понижается эффективность раздражения.

Выводы. Анализ результатов исследования раздражимости по биолюминесцентной и двигательной реакциям копепода позволяет выделить систему, обеспечивающую достаточно автономный механизм светоизлучения. Этот механизм отличается высокой динамичностью, функциональной подвижностью, отличной от той, которая присуща обыкновенным двигательным реакциям. Характерные черты возникновения и проведения возбуждения, обеспечивающего в конечном счете реакцию свечения, свидетельствуют о специализированном статусе такой системы, специфичность которой, очевидно, сформировалась в результате эволюционных преобразований.

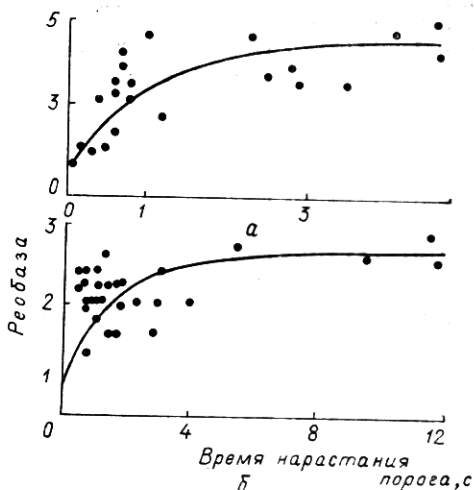


Рис. 3. Зависимость величины реобазы от времени нарастания порога раздражения у *Pleuromamma abdominalis* (а) и *Lucicutia flavicornis* (б)

1. Биolumинесценция моря/И. И. Гительзон, Р. И. Чумакова, В. И. Дегтярев. — М.: Наука, 1969. — 183 с.
2. Битюков Э. П. Люминесценция *Noctiluca miliaris* и характеристики ее раздражимости // Журн. эвол. биохимии и физиологии. — 1966. — 2, № 5. — С. 452—456.
3. Битюков Э. П., Евстигнеев П. В. Основные черты светоизлучения и его видовая специфичность у копепод рода *Pleuromamma* // Экология моря. — 1982. — Вып. 11. — С. 53—62.
4. Евстигнеев П. В. Исследование раздражимости морской светящейся копеподы *Pleuromamma* Piseki // Там же. — 1984. — Вып. 17. — С. 90—93.
5. Евстигнеев П. В. О влиянии силы и длительности электрического раздражения на характеристики светоизлучения морских копепод // Журн. общей биол. — 1985. — 4, № 1. — С. 102—107.
6. Латманизова Л. В. Очерк физиологии возбуждения. — М.: Высш. школа, 1972. — 272 с.
7. Насонов Д. Н. Местная реакция цитоплазмы и распространяющееся возбуждение. — М.: Изд. АН СССР, 1959. — 435 с.
8. Clarke G. L., Conover R. J., David C. N., Nicol J. A. Comparative studies of luminescence in copepods and other marine animals // J. Mar. Biol. Assoc. U. K. — 1962. — 42. — P. 541—564.
9. Harvey E. N. Bioluminescence. — N. Y.: Acad. Press, 1952. — 649 p.

Ин-т биологии юж. морей
им. А. О. Ковалевского АН УССР, Севастополь

Получено 19.09.88

P. V. EVSTIGNEEV

STUDIES IN EXCITATION OF COPEPODS BY THEIR MOTOR AND BIOLUMINESCENT RESPONSE

Summary

Characteristics of marine Copepoda excitation were studied, the motor and bioluminescent responses being analyzed. It is established that excitation thresholds of bioluminescence are always higher. The factor of hyperbole curvature „force-duration“ is also higher for bioluminescent responses. The analysis of light-emission parameters at the threshold excitations within the investigated time scale testifies to the fact that the bioluminescent system is governed to a greater degree by the duration of outer stimuli after reaching the threshold density of excitation. The accommodation constants determined for the reaction of the Copepoda light emission proved to be lower than those presented for nerves of crustaceans. The results of the study conducted permit the system providing light emission in Copepoda to be isolated into the autonomous mechanism, which is characterized by high dynamicity and functional mobility, thus evidencing for its specialized status.