



В. С. Муханов, канд. биол. наук, зав. лаб.

Институт биологии южных морей им А. О. Ковалевского Национальной академии наук Украины, Севастополь, Украина

КОНЦЕПЦИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО БАЛАНСА В ПРИЛОЖЕНИИ К МИКРОБНОЙ ПИЩЕВОЙ СЕТИ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ

Современная система взглядов и представлений об организации и механизмах регулирования потоков энергии в водных экосистемах требует ревизии, поскольку в её основу положен ряд ошибочных постулатов: 1) поток энергии через экосистему – следствие лишь трофодинамики и не включает иных процессов; 2) дыхание – единственный катаболический процесс в столбе воды, вкладом анаэробных процессов в интегральный метаболизм микроорганизмов можно пренебречь; 3) источники теплопродукции в пробе воды связаны исключительно с внутриклеточным метаболизмом. Отсутствие заметного прогресса в развитии концепции энергетического баланса водных экосистем обусловлено, прежде всего, несовершенством методов прямого измерения диссипации тепловой энергии биологическими системами. Острый дефицит данных о физиологической активности микропланктонных организмов восполняется косвенными оценками скорости их метаболизма на основе измерений материальных потоков (в первую очередь, продукции). В физиологических исследованиях преобладает экстенсивный подход, при котором предпочтение отдаётся измерению суммарного дыхания сообщества в единице объёма биотопа, а удельные скорости метаболизма, как правило, игнорируются. Корректность применения респирометрии для измерения потоков энергии в водных экосистемах подвергается сомнению и, следовательно, восполнение дефицита биоэнергетических данных требует кардинальной смены методологии исследований. В качестве одного из решений проблемы предлагается использование нанокалориметрии – высокочувствительного метода *прямого* измерения скорости теплового потока, который не требует концентрирования проб микропланктона.

Ключевые слова: энергетический баланс, потоки вещества и энергии, дыхание, респирометрия, теплопродукция, микрокалориметрия, нанокалориметрия, микробная петля, водные экосистемы

История формирования системных представлений о балансе вещества и энергии в водных экосистемах насчитывает не один десяток лет, а их концептуальная и методологическая основы были сформулированы в ставших теперь классическими работах П. Бойзен-Иенсена [21], Л. А. Зенкевича [7], Г. Г. Винберга [3], В. С. Ивлева [8], Р. Линдемана [38], А. Ф. Алимова [1]. Теория была наполнена фактическими данными о функциональных характеристиках различных групп водных организмов [2, 4, 5, 11]. Значительный прогресс был достигнут и в понимании структуры пищевых цепей в водных экосистемах и, в частности, микробной пищевой цепи и микробной «петли» [18, 49, 53]. Степень формализации накопленных в этой области знаний велика, широко используются имитационные модели водных экосистем, их структуры и материальных потоков [58].

Некоторые из них доступны в Интернете, например, ECPATH и ECOSIM [23] (<http://www.ecopath.org>). В такие модели обычно включён анализ энергетического баланса исследуемой экосистемы, концептуальной основой которого по-прежнему служит классическая модель Г. Г. Винберга [60], что свидетельствует как о её глубине и фундаментальности, так и о том, как мало изменилось в этой области исследований с середины XX в. Авторы ECPATH поясняют, что, поскольку данные о скорости дыхания сообщества не всегда доступны, программа предусматривает возможность её аппроксимации на основе остальных статей бюджета (продукции, рациона, ассимиляции), т.е. материальных потоков. К сожалению, это – обычная практика, и основана она на допущении, что валовая (K_1) и чистая (K_2) эффективности роста неизменны для данной

группы организмов, что противоречит многочисленным экспериментальным свидетельствам вариативности этих коэффициентов и их зависимости от большого круга факторов (см. анализ в [5]). Почти 80% публикаций из базы данных ASFA (Aquatic Sciences and Fisheries Abstracts), в которых идёт речь об энергетическом бюджете (или балансе) водных экосистем, представляют результаты измерения *потоков вещества* в пищевой цепи, но не энергии. Понятие «поток энергии» при этом отождествляется с потоком вещества через пищевую цепь и нередко определяется как «трофический поток энергии» (trophic energy flow [35]). Подобное упрощённое определение потоков энергии в водных экосистемах широко используется и в целях популяризации научных знаний (например, в школьном курсе или онлайн-энциклопедиях). Действительно, биомассы отдельных компонентов пищевой цепи могут быть представлены их энергетическими эквивалентами (энтальпией сгорания, измеренной в калориметрической бомбе [25]), а потоки вещества в трофической цепи – эквивалентными «потоками энергии». Подобный подход полезен при приведении всех статей бюджета биологической системы к «общему знаменателю», т.е. к одной из единиц измерения – энергии, кислороду или углероду. Однако он не позволяет в полной мере отразить суть понятия «поток энергии».

В соответствии с формулировкой Р. Линдемана [38], *поток энергии* в водных экосистемах – следствие метаболической активности всех входящих в неё организмов, продуцирующих тепловую энергию в соответствии со вторым законом термодинамики. Иными словами, поток энергии в экосистеме – это её энергетические траты на поддержание материальной структуры и материальных потоков, которые объединяют эту структуру в единое целое (трансформацию органического вещества, его «прокачку» с одного трофического уровня на другой) [3, 8, 38]. Движущая сила материальных потоков во всех живых системах (включая водные) – свободная энергия Гиббса, получаемая в катаболических процессах [34]. Эффективность (или КПД по определению [5]) использования энергии в сообществах и экосистемах может меняться с неизбежным изменением в соотношении потоков вещества и энергии (и, конечно, с отклонениями коэффициентов K_1 и K_2 от ожидаемых величин). Таким образом, количественное определение потока энергии в сообществе или экосистеме состоит в измерении ско-

рости их *интегрального метаболизма* или, используя общепринятую, но не совсем корректную терминологию, – *интегрального дыхания*. Процесс потребления кислорода живой системой рассматривается в качестве эквивалента теплопродукции; эти величины взаимоконвертируемы с помощью оксикалорийного коэффициента В. С. Ивлева [32], равного 20 Дж (4.8 кал) $\text{мл}^{-1} \text{O}_2$, независимо от уровня организации исследуемой биологической системы, будь то организм или целое сообщество [51]. В приложении к водным экосистемам понятия «потребление кислорода», «дыхание» и «метаболизм» используют в качестве синонимов, а первичную продукцию и дыхание традиционно измеряют в единицах выделения и потребления кислорода.

Таким образом, в системных исследованиях водных экосистем сложилась следующая ситуация: в действительности измеряем *потоки вещества*, но из-за нехватки или отсутствия физиологических данных интерпретируем их как *потоки энергии*. Этот подход применяется широко, несмотря на многочисленные экспериментальные свидетельства несоответствия результатов респирометрии оценкам скорости дыхания, полученным расчётным путем на основе данных о материальных потоках (в исследованиях планктона – см. [54]). Поскольку дефицит физиологических данных является следствием технических и методических трудностей в измерении скорости метаболизма гидробионтов и их популяций *in situ*, трудно ожидать изменения ситуации в лучшую сторону в ближайшем будущем, но, по крайней мере, о проблеме уже заявлено авторитетными исследователями [24].

О качестве респирометрических исследований планктона и его размерных групп. Для анализа выборки респирометрических и калориметрических данных, полученных исследователями (43 публикации) для суммарного сообщества планктона (нативных проб воды) и его групп (фракций) в различных водных биотопах (рис. 1), значения приведены к общим шкалам дыхания и теплопродукции с помощью оксикалорийного коэффициента $-450 \text{ кДж моль}^{-1} \text{O}_2$ [29] и дыхательного коэффициента (RQ) 0.8 [56]. Диапазон изменения величин составляет 6 порядков – от 0.01 до 25000 $\text{мкмоль O}_2 \text{ л}^{-1} \text{сут}^{-1}$, что эквивалентно теплопродукции от 60 нВт до 130 мВт л^{-1} .

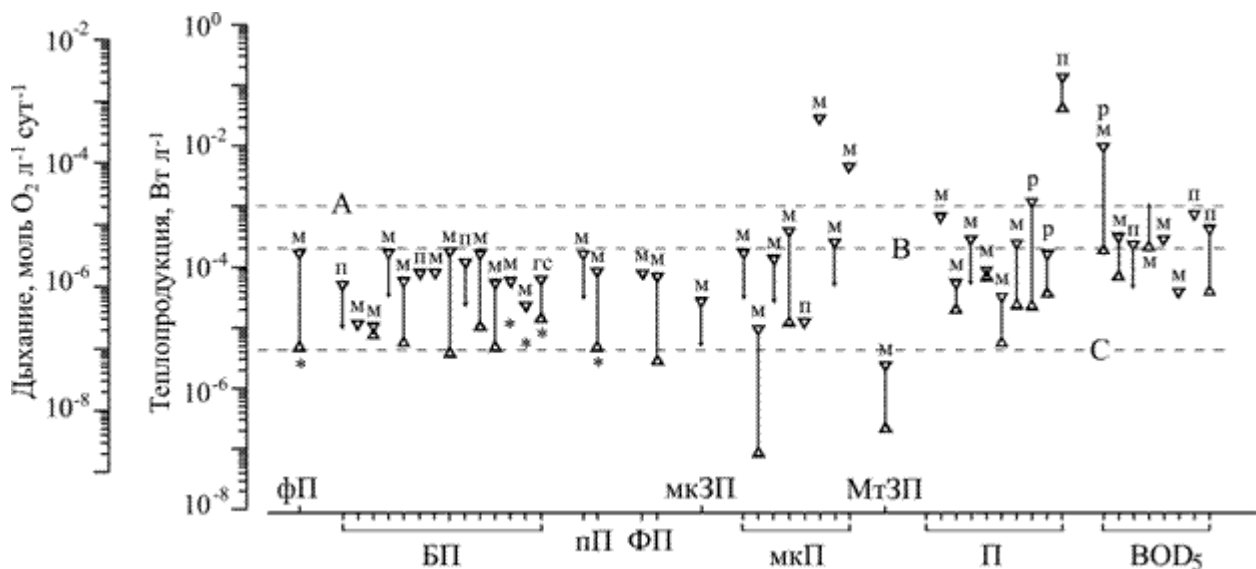


Рис. 1 Диапазоны изменчивости потоков энергии в сообществе планктона по литературным данным (43 публикации): фП – фемтофракция планктона; БП – бактериопланктон; пП – пикопланктон; ФП – фитопланктон; мкЗП – микрозоопланктон; мкП – микропланктон; МтЗП – метазоопланктон; П – планктон; BOD – биохимическое потребление кислорода. Звёздочками отмечены микрокалориметрические измерения теплопродукции микроорганизмов. Биотопы: морские (м), пресноводные (п), распреснённые (р), гиперсолёные (гс). А, В, С – верхние и нижний пределы потоков энергии (объяснения в тексте)

Fig. 1 Variability of energy flows through plankton community (data from 43 publications): фП – femtoplankton ($<0.2 \mu\text{m}$); БП – bacterioplankton; пП – picoplankton ($0.2 - 2 \mu\text{m}$); ФП – phytoplankton; мкЗП – microzooplankton; мкП – microplankton; МтЗП – metazooplankton; П – plankton; BOD – biochemical oxygen demands. Asterisks mark direct calorimetric measurements of heat production by microorganisms. Biotores: marine (м); freshwater (п); brackish (р); hypersaline (гс). А, В, С – upper and bottom limits of energy flows (explanations are in the text)

Достоверность представленных на рис. 1 данных (в первую очередь, экстремумов значений) можно оценить, сравнивая их с некоторыми экспериментально проверенными величинами, например, теплопродукцией активно растущей (в стадии экспоненциального роста) бактериальной культуры. Бактерии выбраны для этой проверки, поскольку на их долю приходится до 70 % суммарного темнового дыхания микропланктона [20]. Тепловыделение культуры кишечной палочки составляет около 1 мВт л^{-1} (рис. 1, линия А) при её плотности 10^6 кл мл^{-1} , которая соответствует максимальной концентрации бактериопланктона в море [14, 15]. При этом биомасса культуры в 20 раз превышает биомассу бактериопланктона из прибрежных вод (объём бактериальной клетки в культуре около 2 мкм^3 , в морской пробе – около 0.1 мкм^3 [14]), а интенсивность теплопродукции кишечной палочки около 1 пВт кл^{-1} [19] (против 75 фВт кл^{-1} в бактериопланктоне [44,

46]). Можно ожидать, что теплопродукция пробы морской воды, содержащей, кроме бактерий, и другие организмы планктона, не может превышать 1 мВт л^{-1} . Это подтверждает и наш опыт применения микрокалориметрии в исследовании микроорганизмов [43 – 46]. Величины дыхания, приводимые, по крайней мере, в 5 из 43 публикаций, являются артефактами, поскольку значительно превышают предел А.

По нашим данным [44, 46], максимум интенсивности теплопродукции бактериопланктона в эвтрофных прибрежных водах Севастопольской бухты (Чёрное море) составлял 100 фВт кл^{-1} . При численности бактерий в воде 10^6 кл мл^{-1} суммарная теплопродукция бактерио- и пикопланктона не могла быть выше 0.1 мВт л^{-1} (рис. 1, линия В). Массив данных по бактерио-, пико- и фитопланктону лежит ниже этого предела (рис. 1), тогда как значения, полученные для мкП, П и BOD₅, несколько превышают его. Эта тенденция хорошо заметна на

графике и может быть обусловлена дополнительным вкладом многоклеточного планктона в общий поток энергии сообщества.

Проверка нижних экстремумов значений может строиться на тех же принципах, с учётом минимальной численности бактериопланктона в морях около 10^5 кл мл⁻¹. По [43 – 46], минимальная средняя для всей пробы интенсивность теплопродукции бактериопланктона – около 5 фВт кл⁻¹. Расчётный минимум потока энергии через сообщество в этом случае – около 5×10^{-7} Вт л⁻¹, однако в соответствии с [43 – 46] эта величина никогда не была ниже 4×10^{-6} Вт л⁻¹ (рис. 1, уровень С). В двух из представленных на рис. 1 диапазонах величины скорости дыхания мкП и МетаЗП выходят за оба нижних предела, хотя исследуемые фракции воды содержали не только многоклеточные организмы, но и бактериопланктон. Источником артефактов могли быть технические небрежности в постановке экспериментов и внеклеточные химические процессы [50, 51], о которых речь пойдет ниже.

Обобщая сказанное, можно выделить две проблемы применения респирометрического подхода в исследовании энергетики планктона: а) исключительно высокую и трудно объяснимую вариабельность величин и б) большой процент артефактов. Одна из причин появления в публикациях артефактов заключается, вероятно, в доминировании экстенсивного подхода над интенсивным: скорость дыхания измеряют в единице объёма пробы, но, располагая данными о численности микроорганизмов, не оценивают интенсивности дыхания на клетку. Такие расчёты помогли бы избежать грубых ошибок, позволив выбраковывать некачественные результаты. и, кроме того, способствовали бы восполнению дефицита информации об интенсивности метаболизма планктонных микроорганизмов *in situ*.

Новое в методологии измерения потоков энергии в водных экосистемах. Применение респирометрии для количественной оценки метаболической активности водных организмов основано на допущениях: а) ката-

болизм представлен исключительно аэробными процессами и б) потребление кислорода в темновых условиях эквивалентно теплопродукции, причём обе величины могут быть пересчитаны друг в друга с помощью оксикалорийного коэффициента [29, 32], величина которого постоянна и специфична для каждого вида пищевого субстрата, «сжигаемого» в процессах дыхания. Принимая изменение энтальпии процессов анаболизма равным нулю [37], понятие «поток энергии» (через биологическую систему), по сути, приравнивают к понятиям «катаболизм» и «темновое дыхание» и, как уже отмечено, измеренную в эксперименте скорость дыхания интерпретируют как поток энергии. Подобные допущения нередко используют и для получения на основе данных респирометрии информации о термодинамических свойствах организмов или сообществ [17].

Сомнения в корректности такого подхода высказывались давно [55], практически с начала его использования в крупных международных проектах, таких как «International Biological Program», в рамках которого определяли энергетические бюджеты разных экосистем. Респирометрический подход имеет два серьёзных недостатка, ставящих под сомнение корректность его применения для количественной оценки потоков энергии в водных экосистемах. Во-первых, опасно определять дыхание как единственный катаболический процесс в столбе воды в относительно неблагоприятных условиях *in situ* и, таким образом, приравнивать результаты прямой и непрямой калориметрии [37, 50, 51]. Во-вторых, в водной среде могут протекать иные окислительные процессы, которые, также как и дыхание, будут проявляться в виде потребления кислорода [50, 51]. И тогда дыхание нельзя рассматривать в качестве единственного кислород-потребляющего процесса, а наибольшая ошибка в его измерении, вероятнее всего, может быть связана с мельчайшими микробными фракциями планктона, в которых дыхание «маскируется» иными окислительными процессами, происходящими в среде

вне живых клеток.

По предположению М. Паматмата [51], респирометрия даёт заниженные оценки скорости метаболизма планктона, т.е. получаемые в эксперименте величины теплопродукции могут превышать дыхание в 2 и более раз (что не согласуется, по крайней мере, с верхними экстремумами на рис. 1). Среди возможных причин такого расхождения данных он указывает: занижение оценок дыхания планктона вследствие некоторых внеклеточных кислород-продуцирующих процессов; завышение оценок теплопродукции планктона вследствие существования некоторых небиологических источников теплопродукции в пробе (подобные результаты получены нами для фемтофракции планктона [43]); существенный вклад анаэробных процессов в интегральный метаболизм микроорганизмов пелагиали. Суть гипотезы, призванной объяснить феномен и названной им «новой теорией динамики O_2 », состоит в том, что изменения концентрации кислорода в экспериментальных склянках в ходе темновых экспериментов обусловлены не только дыханием организмов, но и присутствием в воде восстановленных форм кислорода (пероксиды, гидроксил-радикалы) и их химическими превращениями с выделением свободного кислорода и тепловой энергии (для разложения пероксида водорода $\Delta H = -196$ кДж). М. Паматмат предположил, что эти процессы имеют место только на начальной стадии инкубирования пробы морской воды в темновых условиях, когда величины теплопродукции существенно превышают дыхание той же пробы (точнее, его эквивалент в единицах теплового потока). Таким образом, респирометрия, по его мнению, не может быть использована для измерения потоков энергии в водных экосистемах, а современная концепция их энергетического бюджета не может строиться на следующих постулатах: 1. Поток энергии через экосистему – следствие лишь трофодинамики и не включает иных процессов. 2. Поток энергии через планктонное сообщество может быть измерен непосредственно как потребление кислорода пробой воды.

3. Темновое потребление кислорода пробой эквивалентно химическому окислению органического вещества *in vitro* и всегда является надёжной мерой скорости дыхания/метаболизма организмов в этой пробе [51]. Такой вывод, пожалуй, чересчур пессимистичен, особенно если учесть нехватку физиологических данных в исследованиях водных экосистем. Вместе с тем, существует и достойная альтернатива респирометрии – прямая калориметрия.

Прямое измерение потока тепловой энергии, продуцируемой организмами, калориметрическим методом укладывается в рамки ранее разрабатываемых и современных концепций, но инструментальное оснащение, доступное для подобных измерений, считалось менее надёжным, чем химические методы, в первую очередь вследствие его сложности. Изобретение полупроводниковых термопиле открыло путь для применения калориметров в современных экологических исследованиях. В комбинации с респирометрией микрокалориметрия образует мощный методологический тандем, позволяющий дифференцировать как аэробную, так и анаэробную компоненты метаболизма биологической системы [29]. Его применение в гидробиологии, в частности в исследованиях функционирования водных экосистем и анализе их энергетического бюджета представляется весьма перспективным.

Предпосылки для применения микрокалориметрии в исследованиях бактериопланктона. Прямая калориметрия – мощный аналитический метод, потенциал которого был успешно реализован в некоторых из областей микробной экологии, в частности в исследованиях микрофлоры почвы [48] и морских донных осадков [52]. Одна из причин медленной экспансии микрокалориметрии в планктонологии состоит в недостаточной чувствительности метода – концентрация биомассы в пробах недостаточно велика для измерения её теплопродукции [43 – 46]. Порог чувствительности микрокалориметра – чуть ниже 1 мВт, что эквивалентно теплопродукции приблизительно 1 млн. метаболически активных клеток кишеч-

ной палочки, интенсивность теплопродукции которых составляет около 0.8 пВт кл⁻¹ [19]. В планктоне скорость дыхания бактерий изменяется в диапазоне от 0.18 до 0.41 пг O₂ кл⁻¹ сут.⁻¹ (данные для Чёрного моря [16]), что эквивалентно интенсивности теплопродукции от 30 до 67 фВт кл.⁻¹ при оксикалорийном коэффициенте –450 кДж моль⁻¹ O₂ [29]. Скорость теплопродукции пробы при концентрации клеток 10⁶ кл. мл⁻¹ составит от 0.03 до 0.07 мкВт мл⁻¹, что ниже порога чувствительности микрокалориметра. Таким образом, пробы бактериопланктона должны концентрироваться прежде, чем их теплопродукция может быть исследована с помощью микрокалориметра. Микрофльтрация – один из путей решения этой проблемы [39, 43 – 46].

Фильтрация широко применяется в водной микробиологии, в том числе и в физиологических исследованиях. Как правило, это вынужденная мера, поскольку почти невозможно найти альтернативу фильтрации, если в задачи эксперимента входит выделение тех или иных размерных или функциональных групп микроорганизмов из сложного по своей структуре сообщества микропланктона. Несмотря на немалое количество публикаций, показывающих, что в ходе прямой фильтрации многие микроорганизмы в той или иной степени повреждаются [57], количество работ, в которых применяют фракционирование проб воды, продолжает расти. Что касается процессов, происходящих во фракции планктона в ходе долговременных (часы, иногда сутки) измерений, они пока остаются слабо изученными.

Ранее предпринимались попытки концентрировать фракции планктона на нитроцеллюлозные мембранные фильтры для последующего измерения их теплопродукции (см., напр., [39]), но состояние сообщества до фильтрации и на мембране после неё никак не контролировали. Одна из первостепенных задач, стоящих перед современными исследователями, заключается в том, чтобы перейти от измерения «теплопродукции фракций планктона» (без анализа содержимого фракции, подоб-

ной «чёрному ящику»), и возможности соотнести измеряемый тепловой поток с численностью микроорганизмов) к измерению «интенсивности теплопродукции (= метаболизма) планктонных микроорганизмов» и, таким образом, выйти на качественно новый уровень получения экспериментальных данных.

Концентрирования пробы морского планктона для прямого измерения теплопродукции содержащихся в ней микроорганизмов можно было бы избежать при значительном увеличении чувствительности калориметров. В последнее время рынок калориметрического оборудования пополнился приборами нового поколения – нанокалориметрами, которые позволяют измерять тепловые потоки порядка нескольких десятков нВт. Этот уровень чувствительности достаточен для работы с нативными морскими пробами, однако новые модели нанокалориметров ориентированы под задачи химических лабораторий и, как правило, оборудованы устройством для титрования, что не всегда удобно для гидробиологов. Автор имел опыт эксплуатации одного из таких приборов – модели 5300 2G-NanoITC (производство компании TA Instruments, США), для измерения малых тепловых потоков в нативных пробах морского микропланктона и культурах микроводорослей [42]. Адаптация подобного серийного инструмента к гидробиологическим задачам не была технически сложной: блок для титрования мог быть легко удалён на период проведения измерений. Применение подобного оборудования в экофизиологических исследованиях гидробионтов представляется исключительно перспективным.

Структура и энергетический бюджет микробной петли. Исследование баланса энергии в столь сложных системах, каковыми являются морские экосистемы и их компоненты (включая микробную петлю), невозможно без анализа отдельных статей энергетического бюджета, которые, в свою очередь, связаны со структурой исследуемой системы. Основа микробной пищевой цепи в водных экосистемах – прокариоты, глобальная годовая продукция

которых составляет около 10^{29} клеток, или 10 – 20 Гт в единицах углеродного веса [59]. Это почти половина глобальной первичной продукции океанов, оцениваемой в 50 Гт углерода [26]. Значение гетеротрофного пикопланктона в водных экосистемах трудно переоценить.

Оно в полной мере отражено в концепции микробной «петли» (МП) [18]. На рис. 2 показаны материальные потоки, вовлеченные в МП, её энергетические ресурсы, центры диссипации энергии и сопряжение с микробной пищевой цепью.

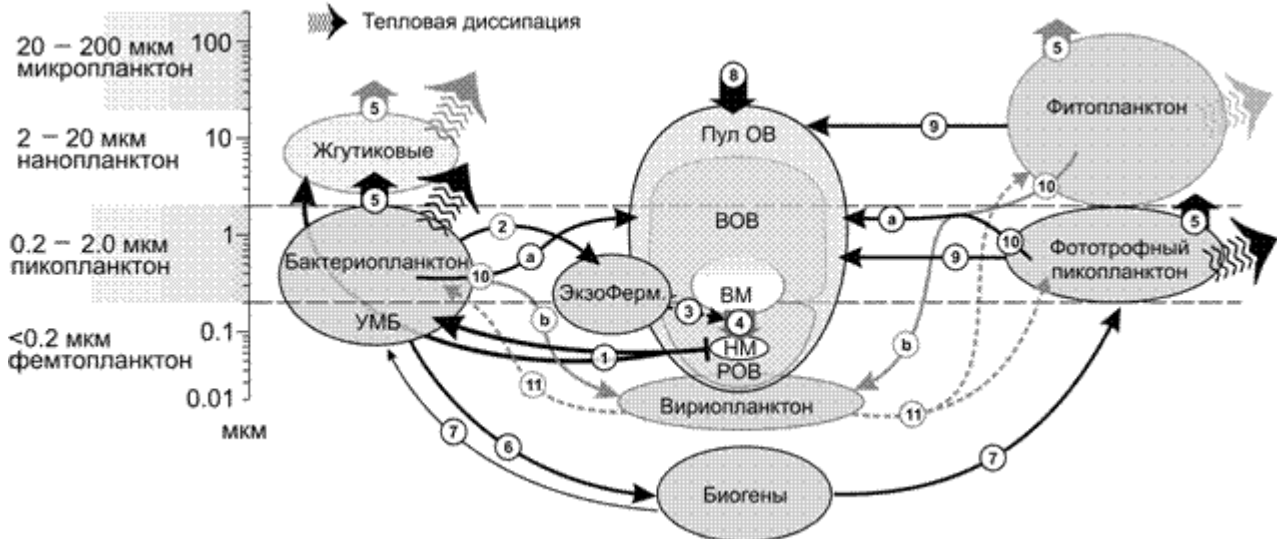


Рис. 2 Упрощённая схема компонентов пелагической микробной пищевой сети и составляющих её потоков вещества и энергии: ОВ – органическое вещество; БОВ и РОВ – взвешенное и растворённое органическое вещество; ВМ и НМ – высоко- и низкомолекулярные соединения; УМБ – ультрамикробактерии. Потоки вещества: 1 – усвоение РОВ в микробной петле; 2 – продукция экзоферментов; 4 – гидролиз биополимеров; 5 – выедание фаготрофами; 6 – минерализация ОВ; 7 – конкурентное усвоение биогенов фототрофами и гетеротрофными бактериями; 8 – поступление БОВ через детритную цепь; 9 – потери первичной продукции; 10 – лизис с высвобождением ОВ и продукцией вирусов (вирусная петля). Механизмы контроля потоков: 3 – каталитический контроль; 11 – контроль вирусной петли вирусами

Fig. 2 Simplified scheme of pelagic microbial food web and involved material and energy flows: OB – organic matter; BOB and ROB – particular and dissolved organic matter; BM and HM – high and low molecular weight substances; УМБ – ultramicrobacteria. Material flows: 1 – DOM uptake in microbial loop; 2 – ecto-enzyme production; 4 – hydrolysis of biopolymers; 5 – grazing by phagotrophs; 6 – OM mineralization; 7 – competitive uptake by phototrophs and bacteria; 8 – POM inflow from detrital food chain; 9 – photosynthesis losses; 10 – cell lysis with OM pool supply and viral production (viral loop). Control mechanisms: 3 – catalytic activity; 11 – viral control

Пулы растворённого (РОВ) и взвешенного органического вещества (БОВ) являются ресурсами МП и пополняются в детритной пищевой цепи (БОВ, поток 8), как фракция (до 10 %, см. [47]) первичной продукции фотоавтотрофов, выделяемая в среду в виде РОВ (поток 9), а также в результате разрушения микроорганизмов вследствие вирусной инфекции в вирусной «петле» [61] (РОВ + БОВ, потоки 10). Суть МП заключается в том, что бактерии (и мелкие жгутиковые) утилизируют пулы РОВ и БОВ (поток 1), возвращая заключённую в них энергию в пищевую цепь посредством: а) их

включения в свою биомассу (т. е. делая её доступной для выедателей – простейших и детритоядных организмов, потребляющих микроорганизмы вместе с детритными частицами [27] – поток 5), б) их реминерализации и поставки первичным продуцентам в виде биогенов (поток 6, 7). Та часть БОВ, которая не утилизируется в МП пелагиали, депонируется в донных осадках [27]. Важно подчеркнуть, что для бактериальной деструкции доступна только часть пула РОВ – низкомолекулярные, легкоусвояемые соединения [20] (поток 1). Остальная часть РОВ и весь БОВ должны пройти вне-

клеточную «обработку» бактериальными ферментами (поток 4 – гидролиз высокомолекулярных органических соединений в столбе воды) в результате экзоферментативной активности бактериопланктона [31], прежде чем они станут доступными для усвоения бактериями (поток 2, контроль 3). Процесс 4 (рис. 2) может быть потенциальным источником теплопродукции в фемтофракции планктона [43].

Сопряжение МП с пищевой цепью реализуется двумя путями – прямым, через выделителей (потoki 5), и опосредованным – через пул биогенов и первичную продукцию (пути 6 и 7). Таким образом, в МП осуществляется интенсивный рециклинг вещества и энергии. Материальные потоки 1, 2, 4 и 6 (рис. 2) обеспечиваются энергией в метаболических процессах пикопланктона. На схеме поток энергии в МП представлен, как диссипация энергии гетеротрофным (слева) и фотоавтотрофным (справа) пикопланктоном. Эти энергозатраты могут быть измерены косвенно – как дыхание микроорганизмов в пикофракции (см. рис. 1), или непосредственно – как диссипация ими тепловой энергии [43 – 46].

Обилие фотоавтотрофных микроорганизмов в пикопланктоне Чёрного моря невелико, около $10^1 - 10^2$ кл мл⁻¹ эукариотных пиководорослей и $10^2 - 10^4$ кл мл⁻¹ цианобактерий [6]. Их суммарная биомасса мала в сравнении с биомассой бактериопланктона (за исключением периодов «цветения» цианобактерий), а вклад в общую теплопродукцию пикопланктона, соответственно, незначителен [46]. Таким образом, в контексте анализа потоков энергии в сообществе пикопланктона (его суммарного *темнового* дыхания или теплопродукции) и в приложении к «типичным» пробам воды (отобраным вне периода «цветения» цианобактерий) термины «пикопланктон», «гетеротрофный пикопланктон» и «гетеротрофные бактерии» могут использоваться как синонимы.

Измерение потока энергии в микробной петле и в частности в сообществе бактериопланктона – одна из ключевых задач при построении любых имитационных моделей вод-

ных экосистем. Отношение дыхания бактериопланктона (ДБ) к первичной продукции является показателем рециклинга той её части, которая выделена фитопланктоном в виде РОВ. Если измерить ДБ невозможно, применяют иные схемы расчёта, основанные на аппроксимациях. Вместо величины ДБ может использоваться, например, отношение продукции бактериопланктона к чистой эффективности (K_2) бактериального роста *in situ* [22]. Если бактериальную продукцию измеряют экспериментально, то эффективность роста *априори* принимается равной некоторому значению в диапазоне между 0.4 и 0.5 [36, 40]. Именно на этом этапе в модель закладывается неопределённая ошибка, поскольку величина K_2 может меняться в зависимости от локальных условий (температура, трофность и т.д.). Например, в океанических водах K_2 иногда снижается до 0.15 в соответствии с экспериментальными данными [24].

Вклад ультрамикробактерий (УМБ) в суммарный метаболизм бактериопланктона, по-видимому, мал вследствие их малых размеров (< 0.07 мкм³ [28]) и биомассы. Тем не менее, в ряде работ [43, 46] представлены свидетельства того, что скорость метаболизма в единице объёма клетки у УМБ выше, чем у «нормальных» бактерий во фракции 0.2 – 2 мкм. Если так, то вклад УМБ в суммарный энергетический бюджет бактериопланктона нельзя игнорировать. Проблемы физиологического статуса УМБ и активации копиотрофов в пуле УМБ рассмотрены в [44].

Специфика МП состоит и в том, что в неё вовлечен вириопланктон, как часть РОВ. Лизис клеток (поток 10, рис. 2), являющийся результатом вирусной инфекции и пополняющий пулы ОВ (10а) и численность вириопланктона (10b), черпает энергию из того же источника, что и вся МП, – метаболической активности пикопланктона. Потоки 10а и 10b образуют «вирусную петлю» [61], встроенную в МП, «работающую» против неё (перекачка органики, включенной в живую биомассу, обратно в пулы ВОВ и РОВ) и конкурирующую с нею за энергетические ресурсы, причём «за-

хваченная» энергия обеспечивает продукцию лишь вирусной биомассы (как части РОВ). Энергетический бюджет вирусной петли «спрятан» в бюджете МП. Попыток определить его экспериментально в природных сообществах пока не предпринималось, сделан лишь первый шаг в микрокалориметрических экспериментах с модельной системой – штаммом В кишечной палочки и фагом Т4 [30]. Микрокалориметрия в сочетании с одним из протоколов концентрирования пикопланктона, предложенным и апробированным нами в [11, 41], могут послужить основой методологии измерения энергетического бюджета вирусной петли *in situ*. Её суть заключается в экспериментальном манипулировании вероятностью встреч между вирусными частицами и клетками хозяев, которая достигается посредством циклических рефильтраций одной и той же пробы воды через нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0.1 мкм. При этом бактериальные клетки иммобилизуются на мембране, в то время как вирусные частицы многократно проносятся потоком воды сквозь бактериальный «ковёр» на мембране, увеличивая вероятность инфицирования бактерий. Таким образом, в экспериментальных условиях можно контролировать степень инфицирования бактериальных клеток фагами и при этом проводить измерение теплопродукции концентрированной пробы бактериопланктона в соответствии с [43, 44, 46].

Заключение. Современная система взглядов и представлений об организации и механизмах регулирования потоков энергии в водных экосистемах требует ревизии, поскольку в её основу положен ряд ошибочных постулатов: 1) поток энергии через экосистему – следствие лишь трофодинамики и не включает иных процессов; 2) темновое потребление кислорода пробой воды эквивалентно химическому окислению органического вещества *in vitro* и всегда является надёжной мерой скорости дыхания/метаболизма организмов в этой пробе; 3) дыхание – единственный катаболический процесс в столбе воды, вкладом анаэробных процессов в интегральный метаболизм

микроорганизмов пелагиали можно пренебречь; 4) источники теплопродукции в пробе воды связаны исключительно с внутриклеточным метаболизмом. При оценке энергетического бюджета микробных процессов в столбе воды следует принимать во внимание данные о структуре и функционировании вирусной петли, физиологии ультрамикробактерий, гидролизе высокомолекулярных органических соединений в результате экзоферментативной активности бактериопланктона.

Отсутствие заметного прогресса в развитии концепции энергетического баланса водных экосистем связано с несовершенством методов прямого измерения диссипации тепловой энергии биологическими системами. Прежде всего, имеется острый дефицит данных о физиологической активности планктонных микроорганизмов *in situ*, который восполняется косвенными оценками скорости их метаболизма на основе данных о материальных потоках (в первую очередь, продукции). Подобная практика – источник артефактов, поскольку реальная величина чистой эффективности роста K_2 , необходимая для расчётов, остаётся неизвестной. Корректность применения респирометрии для измерения потоков энергии в водных экосистемах подвергается сомнению и, следовательно, существует потребность в альтернативных методологических подходах для решения этой задачи. Применение нанокалориметрии в гидробиологических исследованиях в качестве метода *прямого* измерения тепловой *энергии*, диссипируемой микробными сообществами, представляется исключительно перспективным. И, наконец, в физиологических исследованиях преобладает экстенсивный подход, при котором предпочтение отдаётся измерению суммарного дыхания сообщества в единице объёма биотопа (определение BOD_5 , биологической потребности в кислороде, – наиболее яркая иллюстрация такого подхода) и игнорируют удельные скорости метаболизма (на клетку, в единице биообъёма/биомассы, на единицу биоплощади), что значительно снижает качество исследований.

1. Алимов А. Ф. Исследования биотических балансов экосистем пресноводных водоемов в СССР // Гидробиол. журн. – 1987. – **23**, № 6. – С. 7 – 10.
2. Бульон В. В. Закономерности первичной продукции в лимнических экосистемах. – СПб.: Наука, 1994. – 222 с.
3. Винберг Г. Г. Некоторые общие вопросы продуктивности озер // Зоол. журн. – 1936. – **15**, № 4. – С. 587 – 603.
4. Винберг Г. Г. Зависимость энергетического обмена от массы тела у водных пойкилотермных животных // Журн. общ. биол. – 1976. – **37**, № 1. – С. 56 – 70.
5. Заика В. Е. Сравнительная продуктивность гидробионтов. – Киев: Наук. думка, 1983. – 206 с.
6. Заика В. Е., Шевченко В. А., Булатов К. В. Экология морского фототрофного пикопланктона. – М.: Научный центр биологических исследований АН СССР в Пущине, 1989. – 168 с.
7. Зенкевич Л. А. Продуктивность морских водоемов СССР // Тр. фаунист. конф. Зоологического ин-та АН СССР. – Л.: Секция гидробиол., 1934. – С. 11 – 18.
8. Излев В. С. О превращении энергии при росте беспозвоночных // Бюлл. МОИП. Отд. биол. – 1938. – **47**, № 4. – С. 267 – 277.
9. Лебедева М. Н., Чепурнова Э. А., Шумакова Г. В. Интенсивность размножения и скорость дыхания бактериальных сообществ из различных районов Атлантики и Средиземного моря. / Экспериментальные исследования в южной Атлантике и Средиземном море. – К., 1975. – Ч. 3. – С. 217 – 230.
10. Лебедева М. Н. Бактериопланктон и его роль в биопродукционных процессах // Грезе В.Н. Основы биологической продуктивности Черного моря. – Киев: Наук. думка, 1979. – С. 183 – 199.
11. Муханов В. С. Теплопродукция морского пико- и фемтопланктона: автореф. дисс....канд. биол. наук. – Севастополь, 2007. – 24 с.
12. Муханов В. С., Рылькова О. А., Лопухина О. А. Диссипация энергии, продуктивность и скорость оборота биомассы в сообществе бактериопланктона: сравнительные исследования двух водных экосистем. // Экология моря. – 2000. – Вып. 52. – С. 12 – 17.
13. Петина Т. С. Трофодинамика копепод в морских планктонных сообществах. – Киев: Наук. думка, 1981. – 245 с.
14. Чепурнова Э. А., Шумакова Г. В., Бучакчийская А. Н. Размерная структура морского бактериопланктона по результатам измерения клеток на на мембранных ультрафильтрах "Сынпор - 6" и "Сынпор-7" // Микробиология. – 1988. – **57**, № 1. – С. 146 – 151.
15. Чепурнова Э. А., Шумакова Г. В., Гутвейб Л. Г. Бактериопланктон / Планктон Черного моря. – Киев: Наук. думка, 1993. – С. 110 – 142.
16. Шумакова Г. В. Сезонная динамика дыхания бактериопланктона в Севастопольской бухте // Экология моря. – 1987. – Вып. 9. – С. 25 – 29.
17. Aoki I. Entropy production of living systems from organisms to ecosystems / Proc. 9th ISBC Conf. "Calorimetry and thermodynamics of biological processes" (Berlin, 27-31 May 1994). – Berlin, 1994. – P. 114.
18. Azam F., Fenchel T., Field J. G. The ecological role of watercolumn microbes in the sea // Mar. Ecol. Prog. Ser. – 1983. – Vol. 10. – P. 257 – 263.
19. BioActivity Monitoring Seminar Notes. – № 90 01 8697. – P. 87 – 88.
20. Blight S. P., Bentley T. L., Lefevre D. Phasing of autotrophic and heterotrophic plankton metabolism in a temperate coastal ecosystem. // Mar. Ecol. Prog. Ser. – 1995. – **128**. – P. 61 – 75.
21. Boysen-Yensen P. Valiation of the Limfyjord // I. Rep. Dan. bion. sta. – 1919. – **26**, № 1. – P. 1 – 44.
22. Cho B. C., Azam F. Major role of bacteria in biogeochemical fluxes in the ocean's interior // Nature. – 1988. – **332**. – P. 441 – 443.
23. Christensen V., Walters C. J. Ecopath with Ecosim: methods, capabilities and limitations // Ecol. Model. – 2004. – **172**. – P. 109 – 139
24. Del Giorgio P. A., Williams P. J. leB. Respiration in Aquatic Ecosystems. – NY: Oxford Univ. Press, 2005. – 315 p.
25. Duboc P., Marison I., von Stockar U. Quantitative calorimetry and biochemical engineering. / Gallagher P. (ed.) Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry. / Kemp R. B. (ed.) From macromolecules to man. – Amsterdam: Elsevier, 1999. – **4**. – P. 267 – 365.
26. Falkowski P. G., Barber R. T., Smetacek V. Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production // Science. – 1998. – **281**. – P. 200 – 206.
27. Fowler S. W., Knauer G. A. Role of large particles in the transport of elements and organic compounds through the oceanic water column // Prog. Ocean. – 1986. – **16**. – P. 147 – 194.
28. Gazol J. M., del Giorgio P. A., Massana R. Active versus inactive bacteria: size-dependence in a coastal marine plankton community. // Mar. Ecol. Prog. Ser. – 1995. – **128**. – P. 91 – 97.
29. Gnaiger E., Kemp R. B. Anaerobic metabolism in aerobic mammalian cells: information from the ratio of calorimetric heat flux and respirometric oxygen flux // Biochim. Biophys. Acta. – 1990. – **1016**. – P. 328 – 338.
30. Guosheng L., Yi L., Xiangdong C., Peng L. Study on interaction between T4 phage and *Escherichia*

- coli B* by microcalorimetric method // *J. virol. Methods*. – 2003. – **112**, № 1-2. – P. 137 – 143.
31. Hoppe H. G. Use of fluorogenic model substrates for extracellular enzyme activity (EEA) measurement of bacteria. / Kemp P. F., Sherr B., Sherr E., Cole J. J. (eds.) *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. – Boca Raton: Lewis Publishers, 1993. – P. 423 – 432.
32. Ivlev V. S. Eine Mikromethode zur Bestimmung des Kaloriengehalts von Nährstoffen // *Biochem. Z.* – 1934. – **275**. – P. 49 – 55.
33. Kapustina L. L. Bacterioplankton response to eutrophication in Lake Ladoga / Simola H., Viljanen M., Slepukhina T., Murthy R. (eds.) *Ecological Problems Of-Lake Ladoga. Proc. 1st Intern. Lake Ladoga Symp. (St.-Peterb., 22-26 Nov. 1993)*. – St.-Peterb. – 1996. – **322**. – P. 17 – 22.
34. Kemp R. B. Heat dissipation in mammalian cells / Bittar E. E., Bittar N. (eds.) *Principles of Medical Biology*. – Greenwich: JAI Press, 1996. – **4**. – Part III. – P. 303 – 329.
35. Kemp W. M., Boynton W. R. Productivity, trophic structure, and energy flow in the steady-state ecosystems of Silver Springs, Florida // *Ecol. Modeling*. – 2004. – **178**. – P. 43 – 49.
36. Kirchman D. L. Measuring bacterial biomass production and growth rates from leucine incorporation in natural aquatic environments. / Paul J. H. (ed.) *Methods in microbiology. Marine microbiology*. – San Diego: Acad. Press, 2001. – **30**. – P. 227 – 238.
37. Larsson B., Gustafsson L. Calorimetry of microbial processes / Gallagher P. (ed.) *Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry*. / Kemp R.B. (ed.) *From macromolecules to man*. Amsterdam: Elsevier, 1999. – **4**. – P. 367 – 404.
38. Lindeman R. L. The trophic-dynamic aspect of ecology // *Ecology*. – 1942. – **23**, № 4. – P. 399 – 418.
39. Lopukhin A., Kamenir Yu. Size spectra of heat production of Sevastopol Bay microplankton // *Thermochim. Acta*. – 1995. – **251**. – P. 53 – 61.
40. Møller E. F., Nielsen T. G. Plankton community structure and carbon cycling off the western coast of Greenland, with emphasis on sources of DOM for the bacterial community // *Aquat. Microb. Ecol.* – 2000. – **22**. – P. 13 – 25.
41. Mukhanov V. S., Anesio A. M., Kemp R. B. Viral control of material flows, the energy budget and the efficiency of the planktonic microbial loop in the coastal waters of Car-digan bay // *Proc. Int. Conf. "Aquatic Ecology at the Dawn of XXI Century"* in honor of the 100th anniv. of Prof. G. G. Winberg (St. Petersburg, Russia, 3-7 Oct. 2005). – St. Petersburg, 2005. – P. 37.
42. Mukhanov V. S., Hansen L. D., Kemp R. B. Nanocalorimetry of respiration in micro-organisms in natural waters // *Thermochim. Acta*. – 2012. – **531**. – P. 66 – 69.
43. Mukhanov V. S., Kemp, R. B. Microcalorimetry of the smallest plankton fraction: In search for the sources of heat dissipation // *Морс. екол. журн. (Mar. Ecol. J.)*. – 2005. – Спец. вип. 1. – С. 84 – 98 (in English).
44. Mukhanov V. S., Naidanova O. G., Lopukhina O. A. Cell-, biovolume- and biosurface-specific energy fluxes through marine picoplankton as a function of the assemblage size structure // *Thermochim. Acta*. – 2007. – **458**. – P. 23 – 33.
45. Mukhanov V. S., Naidanova O. G., Shadrin N. V. The spring energy budget of the algal mat community in a Crimean hypersaline lake determined by microcalorimetry. // *Aquat. Ecol.* – 2004. – **38**. – P. 375 – 385.
46. Mukhanov V. S., Rylkova O. A., Lopukhina O. A. Productivity and thermodynamics of marine bacterioplankton: an inter-ecosystem comparison. // *Thermochim. Acta*. – 2003. – **397**. – P. 31 – 35.
47. Nagata T. Production mechanisms of dissolved organic matter / Kirchman D. L. (ed.) *Microbial ecology of the oceans*. – New York: Wiley-Liss, 2000. – P. 121 – 152.
48. Núñez-Regueira L., Núñez-Fernández O., Rodríguez Añón J. A. The influence of some physicochemical parameters on the microbial growth in soils. // *Thermochim. Acta*. – 2002. – **394**. – P. 123 – 132.
49. Paffenhofer G.- A., Sherr B. F., Sherr E. B. From small scales to the big picture: persistence mechanisms of planktonic grazers in the oligotrophic ocean // *Marin. Ecol.* – 2007. – **28**. – P. 243.
50. Pamatmat M. M. Non-photosynthetic oxygen production and non-respiratory oxygen uptake in the dark: a theory of oxygen dynamics in plankton communities. // *Mar. Biol.* – 1997. – **129**. – P. 735 – 746.
51. Pamatmat M. M. Heat-flow measurements in aquatic ecosystems. // *J. Plankton Res.* – 2003. – **25**. – P. 461 – 464.
52. Pamatmat M. M., Graf G., Bengtsson W. Heat production, ATP concentration and electron transport activity of marine sediments // *Mar. Ecol. Progr. Ser.* – 1981. – **4**. – P. 135 – 143.
53. Pomeroy L. R. The ocean's food web, a changing paradigm // *BioScience*. – 1974. – **24**. – P. 499 – 504.
54. Pomeroy L. R., Wiebe W. J. Energetics of microbial food webs // *Hydrobiologia*. – 1988. – **159**. – P. 7 – 18.
55. Rigler F. H. The concept of energy flow and nutrient flow between trophic levels / van Dobben W.H., Lowe-McConnell R.H. (eds.) *Unifying concepts in ecology*. – The Hague: Dr W. Junk B.V. Publishers, 1975. – P. 15 – 26.

56. Robinson C., Archer S. D., Williams P. J. Microbial dynamics in coastal waters of East Antarctica: Plankton production and respiration // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* – 1999. – **180**. – P. 23 – 36.
57. Runge J. A., Ohman M. D. Size fractionation of phytoplankton as an estimate of food available to herbivores // *Limnol. Oceanogr.* – 1982. – **27**, № 3. – P. 570 – 576.
58. Watson R., Alder J., Walters C. A dynamic mass-balance model for marine protected areas // *Fish and Fisheries.* – 2000. – **1**, № 1. – P. 94 – 98.
59. Whitman W., Coleman D., Wiebe W. Prokaryotes: the unseen majority // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1998. – **95**. – P. 6578 – 6583.
60. Winberg G. G. 1956. Rate of metabolism and food requirements of fishes // *Transl. Fish. Res. Board Can.* – 1956. – **194**. – P. 1 – 253.
61. Wommack K. E., Colwell R. R. Virioplankton: Viruses in aquatic environments // *Microb. Molec. Biol. Rev.* – 2000. – **64**. – P. 69 – 114.

*Поступила 13 марта 2012 г.
После доработки 15 апреля 2013 г.*

Концепція енергетичного балансу в додатку до мікробної харчової мережі водних екосистем. В. С. Муханов. Сучасна система поглядів і уявлень про організацію і механізми регулювання потоків енергії у водних екосистемах вимагає ревізії, оскільки в її основу покладено ряд хибних постулатів: 1) потік енергії через екосистему - наслідок лише трофодінаміки і не включає інших процесів; 2) подих - єдиний катаболический процес у стовпі води, внеском анаеробних процесів в інтегральний метаболізм мікроорганізмів пелагіали можна знехтувати; 3) джерела теплопродукції в пробі води пов'язані виключно з внутрішньоклітинним метаболізмом. Відсутність помітного прогресу в розвитку концепції енергетичного балансу водних екосистем обумовлена, на думку автора, недосконалістю методів прямого вимірювання дисипації теплової енергії біологічними системами. Гострий дефіцит даних про фізіологічну активність планктонних мікроорганізмів заповнюється непрямыми оцінками швидкості їх метаболізму на основі вимірів матеріальних потоків (в першу чергу, продукції). У фізіологічних дослідженнях переважає екстенсивний підхід, при якому перевага віддається вимірюванню сумарного дихання угруповання в одиниці об'єму біотопу, а питомі швидкості метаболізму, як правило, ігноруються. Коректність застосування респірометрії для вимірювання потоків енергії у водних екосистемах піддається сумніву, отже, заповнення дефіциту біоенергетичних даних вимагає кардинальної зміни методології досліджень. В якості одного з рішень проблеми пропонується використання нанокалориметрії – високочутливого методу прямого вимірювання швидкості теплового потоку, який не вимагає концентрування проб мікропланктону.

Ключові слова: енергетичний баланс, потоки речовини та енергії, дихання, респірометрія, теплопродукція, мікрокалориметрія, нанокалориметрія, мікробна петля, водні екосистеми

Applying the paradigm of energy balance to microbial food web in aquatic ecosystems. V. S. Mukhanov. A revision of the current paradigm of the energy flow in aquatic ecosystems (and, in particular, microplankton) is required as the latter is based on a few false assumptions, namely: (i) the energy flow is coupled exceptionally to trophic processes ("trophic energy flow"); (ii) aerobic respiration is the only catabolic process in the oxic water column; (iii) intracellular metabolism is the only source of heat energy dissipated by water sample. Almost no progress in developing the energy flow paradigm was observed for the last decades, likely owing to imperfections in the methodology for measuring the energy flow directly as heat dissipation. There is a considerable gap in the data on *in situ* physiological activity of planktonic microorganisms, which is filled with indirect estimates of their metabolic rates approximated from material flows (like production). This prevalent approach provides no valuable information on the real metabolic rate but produces its fallacious estimates as the net growth efficiency (K_2) is not actually measured in the same experiment. In microplankton studies, an extensive approach prevails in which integral respiration measurements are favored over estimates of metabolic fluxes per cell, biovolume and biosurface. This limits our knowledge of physiological activity of planktonic microorganisms and, besides, deprives the researcher an opportunity to verify the results obtained. Doubt has been recently thrown on the validity of the respirometric estimates of the energy flows in aquatic ecosystems and, consequently, there exist a demand on alternative methodological approaches to solve the problem. Applying nanocalorimetry in the field of hydrobiology looks promising as a highly sensitive method for measuring directly the heat dissipation by native microplankton, without any cell pre-concentration. Modern knowledge of the viral loop, physiology of ultramicrobacteria, and bacteria-mediated extracellular hydrolysis of biopolymers have to be taken into account to calculate detailed energy budget of microplankton.

Keywords: energy balance, energy and matter flows, respiration, respirometry, heat dissipation, microcalorimetry, nanocalorimetry, microbial loop, aquatic ecosystems