

ISSN 0203-4646

ЭКОЛОГИЯ МОРЯ



22
—
1986

СВЕТОИЗЛУЧЕНИЕ МОРСКИХ КОПЕПОД ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДАХ РАЗДРАЖЕНИЯ

С появлением высокочувствительных фотоэлектронных умножителей в исследованиях характеристик биолюминесценции наметился новый этап, позволяющий оценить светозлучение в реальных физических величинах. Как известно, для большинства морских организмов, в том числе и веслоногих (*Copepoda*, *Crustacea*), обладающих способностью излучать свет, отмечено отсутствие спонтанной биолюминесценции. Световая вспышка происходит только в ответ на различные виды внешнего раздражения — химического, электрического, механического, ультразвукового, термического и т. д. Относительно широкое освещение в современной литературе индивидуальных характеристик биолюминесценции тех или иных организмов предполагает синтез накопленных знаний и их сравнительный анализ. Однако использовать имеющиеся данные в большинстве случаев представляется затруднительным из-за разнообразия применяющейся аппаратуры и методики раздражения биолюминесцентных систем организмов. Поэтому сравнение параметров светозлучения при разных видах стимуляции, определение характерных особенностей того или иного раздражения представляется актуальным.

Материал и методы. Для сравнительного исследования характеристик биолюминесценции использовали химическое, электрическое и механическое раздражения. Химическая стимуляция достигалась добавлением в кювету с организмом 1 мл 30%-ного спирта. Электрическая стимуляция проводилась в кюветах ранее описанной конструкции [1, 2], однако площадь серебряных электродов была доведена до 10 мм², что позволило увеличить объем рабочей камеры. Раздражение организма производилось от электронного стимулятора, который подавал на электроды импульсы длительностью от 0,01 мс до режима постоянного тока и напряжением до 160 В.

Для механического раздражения организмов был сконструирован механический стимулятор. Основным рабочим элементом его является сетка из некоррозирующего металла, перемещающаяся по вертикали в кювете с организмом с амплитудой 40 мм. Возникающее при этом гидродинамическое возмущение стимулирует биолюминесценцию, что вызывает светозлучение.

Система регистрации во всех случаях была аналогична описанной в литературе [2, 3] и унифицирована для разных видов раздражения. Регистрируемые фотоумножителем ФЭУ-29 световые потоки фиксировались на шлейфовом осциллографе, причем отклонение луча гальванометра на 1 мм соответствовало энергетической плотности излучения $0,7 \cdot 10^{-4}$ мкВт·см⁻². Расстояние от поверхности катода до центра рабочей камеры с объектом равно 10 мм.

Эксперименты проводились в период 11-го рейса НИС «Профессор Водяницкий» в тропические районы Атлантики (ноябрь 1981—февраль 1982 гг.). В опытах использовались половозрелые стадии копепод рода *Pleuromamma*, собранные и подготовленные к экспериментам по ранее используемым методикам [3].

Результаты и обсуждение. Химическая, механическая и электрическая стимуляции светозлучения биоллюминесцентоов широко применяются в настоящее время для исследования характеристик световых сигналов организмов, и в первую очередь морских. Однако несмотря на имеющиеся данные, характер раздражения не оказывает влияния на форму биоллюминесцентного сигнала, в частности *Noctiluca miliaris* [1], по нашим данным, для копепод рода *Pleuromamma* различия существуют не только в форме сигналов, но также касаются некоторых энергетических и временных параметров.

Процент высвечивания при различных видах стимуляции у всех исследованных видов приблизительно одинаков и колеблется от 40 до 93 %, хотя при механической стимуляции доля высветившихся организмов заметно ниже.

Временные характеристики. В зависимости от уровня, на котором измерялась продолжительность светозлучения, находится и степень отличия в данных характеристиках при различных видах раздражения. Например, средняя длительность биоллюминесценции *P. gracilis* при химической стимуляции составила более 1 с и превысила среднюю длительность свечения этого вида при электрической и механической стимуляциях в 2 и 7 раз соответственно, причем различия статистически достоверны при расчете по приближенному *t*-критерию. Общая продолжительность свечения *P. borealis* при химической стимуляции в 1,8 раза превышает ее же время свечения при электрической стимуляции, а для *P. indica* такое различие составляет 3,1 раза. Однако, для наиболее крупных видов зависимость обратная. Так, у *P. abdominalis* при химической стимуляции средняя длительность световых ответов соответствует 1 с, а при электрической — 1,7 с, у *P. xiphias* светозлучение при электрической стимуляции почти в три раза продолжительнее и равно 1,4 с: длительность свечения при механическом раздражении близка к таковой (0,5 с) при химической стимуляции. Светозлучение *P. abdominalis* при механической стимуляции несколько короче его продолжительности при электрическом раздражении.

Аналогичные различия существуют для длительностей свечения на уровнях 0,1 и 0,5 амплитуды сигнала ($L_{0,1}$, $L_{0,5}$). Например, продолжительность свечения *P. gracilis* на данных уровнях максимальной амплитуды при химической стимуляции 1,01 и 0,46 с, при электрическом раздражении 0,68 и 0,29 с, а при механическом 0,17 и 0,05 с соответственно (рис. 1). Различия в длительностях биоллюминесценции на уровне 0,9 амплитуды сигнала ($L_{0,9}$) менее отчетливы: они составляют при химическом раздражении 0,07, при электрическом 0,04 и при механическом 0,03 с. Однако наибольшие различия по-прежнему касаются химического и механического видов раздражения. У крупных видов *P. abdominalis* и *P. xiphias* различия в длительностях свечения на данном уровне регистрации отсутствуют. Длительность фронта нарастания ($L_{фр}$) сигнала наиболее велика при химическом раздражении и достигает, например, у *P. gracilis* 0,1 с и минимальна при механическом возбуждении, оказываясь в три раза меньше (см. рис. 1).

Энергетические характеристики. Наиболее существенны различия между исследованными видами стимуляции в энергетических параметрах. Средняя интенсивность биоллюминесценции (H) максимальна при химическом раздражении и, например, для *P. gracilis* она составляет $76,0 \times 10^{-4}$ мкВт·см⁻², а при электрической стимуляции более чем в 5 раз ниже (рис. 2). При механическом раздражении интенсивность свечения более чем на порядок ниже, чем при химической стимуляции. Близкое соотношение отмечено и у других видов. Например, у *P. abdominalis* интенсивность светозлучения при электрическом раздражении в 8, а при механическом почти в 40 раз ниже, чем при химическом. Для *P. xiphias* эти различия соответственно составили 6 и 15 раз. Аналогичные соотношения зафиксированы и в интенсивностях биоллюминес-

ценции на уровнях 0,1 и 0,5 амплитуды вспышки ($H_{0,1}$ и $H_{0,5}$). Например, у *P. gracilis* при химической стимуляции эти величины соответствуют 105,0 и $148,0 \cdot 10^{-4}$ мкВт·см⁻², при электрическом раздражении 20,4 и $36,9 \cdot 10^{-4}$ мкВт·см⁻², при механическом раздражении 1,6 и $3,7 \cdot 10^{-4}$ мкВт·см⁻² (рис. 2).

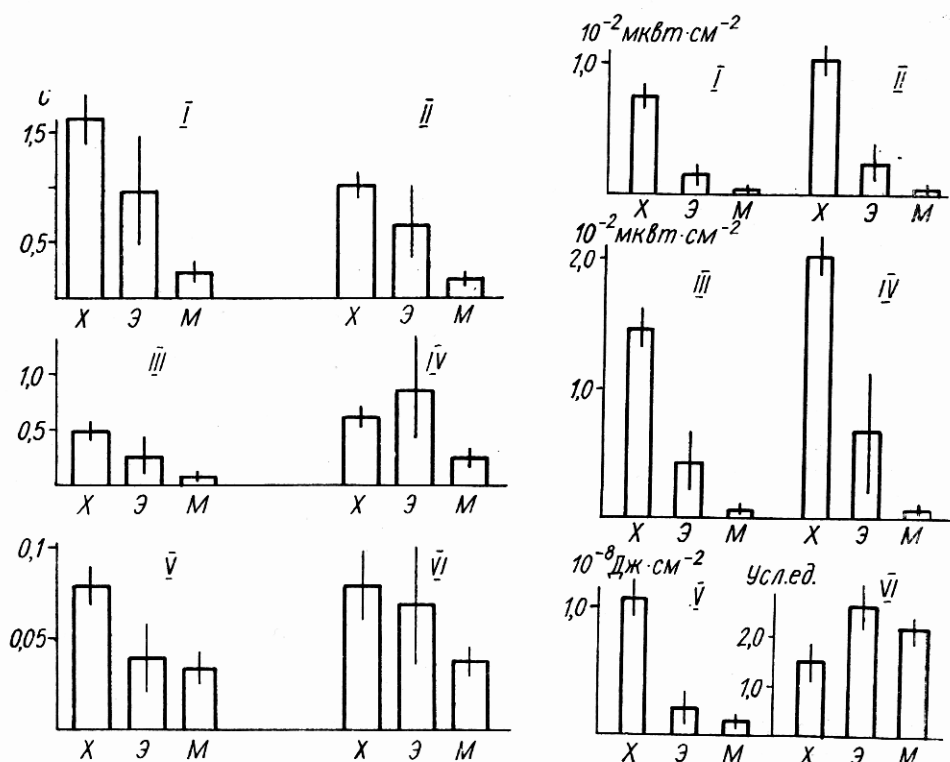


Рис. 1. Длительность единичной реакции светоизлучения:

I — общая, *II* — на уровне 0,1 амплитуды, *III* — на уровне 0,5 амплитуды, *IV* — спада, *V* — на уровне 0,9 амплитуды, *VI* — фронта при разных видах раздражения *P. gracilis* (X — химического, Z — электрического, M — механического).

Рис. 2. Энергетические характеристики единичной реакции светоизлучения *P. gracilis*: *I* — средняя интенсивность вспышек, *II* — интенсивность на уровне 0,1 амплитуды, *III* — интенсивность на уровне 0,5 амплитуды, *IV* — амплитуда, *V* — энергия, *VI* — количество пиков (X — химическая стимуляция, Z — электрическая, M — механическая).

Амплитуда сигнала *A* и общая энергия *E* являются наиболее характерными параметрами, отчетливо отражающими специфику того или иного вида раздражения. Средняя амплитуда, например, *P. gracilis* при воздействии химическим агентом более чем в четыре раза превышает амплитуду сигналов, вызванных электрическим током, и более чем в 40 раз ее значения при механическом возбуждении. У *P. abdominalis* эти различия соответственно составляют 3 и 20 раз. Для остальных видов рода также характерны резкие градиенты в показателях амплитуды сигналов, вызываемых разными раздражителями.

Общая энергия, выделяемая со вспышкой у *P. gracilis*, при химической стимуляции в 5 раз превышает соответствующий параметр при стимуляции током и более чем в 300 раз при механическом раздражении. Для *P. abdominalis* эти различия соответственно составляют 3 и 34 раза. Указанные соотношения в амплитуде и энергии световых сигналов, вызываемых рассматриваемыми видами возбуждения, выявлены и у других видов рода и являются достоверными при уровне безошибочного суждения 95%.

Анализ формы вспышек, описываемых величиной $\frac{A}{L}$, также указывает на зависимость ее от вида раздражения. На *Noctiluca miliaris*

установлено [4], что вид стимуляции не сказывается на форме вспышек. В экспериментах с копеподами при электрической стимуляции вспышки островершинные и компактные во времени. Величина $\frac{A}{L}$ превышала примерно вдвое у *P. gracilis* соответствующий параметр при химической стимуляции. Близкое соотношение отмечено для всех исследованных видов. Форма вспышек при механической стимуляции занимает промежуточное положение, однако ближе по характеру к результатам электрического раздражения.

Таким образом, каждый тип раздражителя оказывает специфическое действие на характер извержения секрета. Однако механическое раздражение, являясь наиболее адекватным стимулятором, ближе по характеру вызываемого светоизлучения к параметрам электрического возбуждения. Общим является и то, что механическую и электрическую стимуляцию можно применять неоднократно для одного и того же организма. Так, при электрическом раздражении получено до 150 вспышек от одного организма в течение нескольких минут.

Химическое раздражение в большинстве случаев приводит к гибели организма, что приводит лишь к частичному использованию светового секрета. Поэтому, используя этот вид стимуляции, невозможно определить действительную величину потенциальной световой энергии, содержащейся в активных гранулах органов биолюминесценции копепод [5].

Указанные черты параметров светоизлучения при использованных способах раздражения объясняются различиями в механизмах воздействия раздражителя на объект исследования. Длительность химических, электрических и механических стимулов является одним из компонентов специфики механизма. Для подтверждения этого можно сравнить результаты химической стимуляции (длительное раздражение, приводящее к гибели животного) и данные стимуляции постоянным током при длительном времени его воздействия. Из таблицы видно, что хотя различия в энергетических параметрах остались прежними, временные характеристики при длительном электрическом воздействии приблизились по своим значениям к таковым при химической стимуляции. В данном случае различие средних при определении всей длительности и длительностей свечения на уровнях 0,1; 0,5 и 0,9 амплитуды сигналов *P. gracilis*, а также времени фронта нарастания несущественно. В этом плане представляет интерес влияние концентрации химического реагента на длительность световых ответов *Noctiluca miliaris* [4].

Характерным признаком вспышек при химической стимуляции является большое число пиков, превосходящих или равных 0,1 максимальной амплитуды сигнала. Так, в среднем для электрической стимуляции *P. gracilis* их число равно $1,2 \pm 0,2$, а в случае химической $1,7 \pm 0,2$. При действии длительного электрического тока на организм число пиков возрастает до $1,78 \pm 0,2$, т. е. становится идентичным таковому при химической стимуляции.

Увеличение длительности биолюминесценции при более продолжительном времени воздействия на рецепторные системы биолюминесцентных раздражителя объясняет тот факт, что проглоченные организмы, например перидиней, продолжают светиться внутри хищника, ставя его в невыгодное положение [7], что, в свою очередь, привело к пигментации пищеварительных трактов у некоторых пелагических планктонофагов. Эти факты свидетельствуют о коэволюционирующем характере развития хищников и их жертв [8].

Как показано выше, при механической стимуляции временные и энергетические характеристики свечения невелики (см. рис. 1 и 2). Невозможность определения истинного времени воздействия механических раздражителей на организм, например, *P. gracilis* прямым путем не исключает использования косвенного метода, основанного на

тесной корреляции между временем воздействия раздражителя и длительностью светового излучения (коэффициент корреляции 0,83). По нашим данным, такое воздействие длится не более 3—5 мс в случае раздражения животного приведенным выше способом. При электрической стимуляции током той же длительности и интенсивностью $1,0 \text{ мА} \cdot \text{мм}^{-2}$ получили сходные характеристики светового излучения для обоих видов раздражения на примере *P. gracilis*. В целом близкие значения параметров биолюминесценции при механической и электрической стимуляциях позволяют подобрать такие значения электростимулов, которые

Результаты сравнения параметров биолюминесценции *P. gracilis* при длительном времени воздействия химического реагента и электрического тока

Характеристика импульса		Вид раздражения	
		химический	электрический
Длительность, с	<i>L</i>	$1,6 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,4$
	<i>L</i> _{0,1}	$1,6 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,4$
	<i>L</i> _{0,5}	$0,5 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,3$
	<i>L</i> _{0,9}	$0,1 \pm 0,01$	$0,1 \pm 0,08$
	<i>L</i> _{сп}	$0,6 \pm 0,07$	$1,1 \pm 0,4$
	<i>L</i> _{фр}	$0,1 \pm 0,01$	$0,2 \pm 0,2$
Интенсивность, $10^{-2} \text{ мкВт} \cdot \text{см}^{-2}$	<i>H</i>	$1,1 \pm 0,2$	$0,17 \pm 0,1$
	<i>H</i> _{0,1}	$0,7 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,2$
	<i>H</i> _{0,5}	$1,1 \pm 0,1$	$0,11 \pm 0,04$
Энергия, 10^{-8} Дж	<i>E</i>	$2,0 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,2$
Количество пиков	<i>N</i>	1,7	1,78

будут вызывать световые вспышки, идентичные вызываемым механически. Таким образом, легко дозируемый электрический вид раздражения может позволить изучать параметры биолюминесценции, имеющие место в нативных условиях. Данный вывод основывается на том, что биофизический механизм возникновения биолюминесценции во всех случаях один — деполяризация внешней мембраны рецепторов и генерация потенциала действия, вызывающего сокращение световых структур.

Выводы. Вид стимуляции (в данном случае химическая, механическая и электрическая) существенно влияет на величины временных и энергетических параметров светового излучения морских копепоид. Максимальные значения данных характеристик отмечены для химического раздражения и минимальные — для механического, причем различие может составлять порядок и более.

Вид стимуляции влияет и на кинетику световых ответов. При химической стимуляции количество вершин наибольшее и достигает 1,7. При других видах раздражения их число в полтора раза меньше.

Длительность воздействия стимула — наиболее существенная характеристика раздражителя, влияющая на все параметры светового сигнала.

Используя тесную корреляцию между длительностью воздействия электрического тока и продолжительностью свечения, а также одинаковые характеристики биолюминесценции *P. gracilis* при химическом воздействии и длительным электрическим установили длительность воздействия механического стимула на исследуемые организмы, равную 3—5 мс.

1. Биолюминесценция моря / И. И. Гительзон, Р. И. Чумакова, В. И. Дегтярев и др. — М.: Наука, 1969. — 183 с.
2. Битюков Э. П. Люминесценция *Noctiluca miliaris* и характеристики ее раздражимости. — Журн. эволюц. биохимии и физиологии, 1966, 2, № 5, с. 452—456.
3. Битюков Э. П., Евстигнеев П. В. Основные черты светового излучения и его видовая специфичность у копепоид рода *Pleuromamma*. — Экология моря, 1982, вып. 11, с. 53—62.
4. Гительзон И. И., Чумакова Р. И. Люминесценция *Noctiluca miliaris* как пример авторегулируемой реакции в клетке. — В кн.: Физико-химические основы авторегуляции в клетках. — М., 1966, с. 207—212. (Тр. Моск. о-ва испытателей природы. Отд. биол.: Т. 28).
5. Евстигнеев П. В. Биолюминесценция *Pleuromamma pisces* при электрической стимуляции. — Экология моря, 1983, вып. 14, с. 56—62.
6. Тарасов Н. И. Свечение моря. — М.: Изд-во АН СССР, 1956. — 204 с.

7. McAllister D. E. A collection of oceanic fishes from off British Columbia with a discussion of the evolution of black peritoneum. — Bull. Nat. Mus. Can., 1961, 172, p. 39—43.
8. Porter K., Porter J. Bioluminescence in marine plankton: a coevolved antipredation system. — Amer. Natur., 1979, 114, N 3, p. 458—461.

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

Получено 14.03.83

P. V. EVSTIGNEEV

LUMINESCENCE OF COPEPODS UNDER STIMULATION OF VARIOUS TYPES

Summary

Statistically significant differences are shown in the characteristics of bioluminescence signals evoked by various types of stimulation. The maximal values of the time and energy parameters of luminescence of copepods from the *Pleuromamma* genus are observed under chemical stimulation. The mechanical excitation induces an order-lower intensity flashes. There are differences in the flash kinetics as well: less synchronous outburst of the light substrate is observed under chemical stimulation than in the case of mechanical and electrical excitations. Duration of the stimulus effect is the most essential characteristic of the irritant affecting all the parameters of the light signal.

УДК 582.263:581.1(262.5)

В. Б. ВЛАДИМИРОВ, О. И. ОСКОЛЬСКАЯ
Ю. С. ЧУРИЛОВ

ВРЕМЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СОСТОЯНИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА У ЧЕРНОМОРСКОЙ *ULVA RIGIDA* (AG.)

Среди водорослей-макрофитов Черного моря одним из перспективных видов с точки зрения увеличения биопродуктивности водоема является *Ulva rigida* (Ag.), так как она обладает высоким темпом роста и имеет пищевую ценность [3]. Промышленный лов ульвы возможен лишь в случае увеличения ее сырьевых запасов путем искусственного выращивания на плантациях по методам, предложенным А. А. Калугиной-Гутник [3] и К. Суббарамаях [5].

Не менее важной особенностью ульвы является ее способность усваивать растворенное в воде органическое вещество и тем самым ослаблять воздействие антропогенного фактора на экологию отдельных участков моря при создании искусственных плантаций.

Существенное значение при культивировании могут представлять данные о биохимических процессах, происходящих в талломе ульвы в период ее роста и размножения. Перспективным подходом для определения состояния энергетического аппарата в разные моменты жизненного цикла может служить метод люминесцентного спектрального анализа.

Нами сделана попытка проследить за изменением состояния энергетического аппарата ульвы на разных этапах ее развития и при воздействии различных факторов среды с целью разработки экспресс-метода определения состояния водоросли.

Материал и методика. Работа выполнена в июне 1981 г. в период интенсивного роста ульвы. Водоросль собирали ежедневно в течение месяца в районе Севастопольской бухты на глубине 1—2 м. В экспериментах использовались водоросли, собранные вместе с субстратом.

Снятие люминесцентного спектра проводили на спектрофлюориметре собственной конструкции, собранном на базе спектрофотометра СФ-4А при длине волны возбуждающего света 365 нм.