

БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ГРЕБНЕВИКА *Pleurobrachia pileus* (O.F. Müller, 1776) В ЛЕТНИЙ СЕЗОН

© 2023 г. А.В. Темных*,#, М.И. Силаков*, О.В. Машукова*

*ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О.Ковалевского РАН»,
просп. Нахимова, 2, Севастополь, 299001, Россия

#E-mail: atemnykh@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.12.2022 г.

После доработки 30.03.2023 г.

Принята к публикации 05.04.2023 г.

Способность к биолюминесценции обнаружена у многих морских гидробионтов, в том числе практически все представители типа гребневики (*Stenophora*) обладают способностью излучать свет. Свечение видов и биолюминесцентных субстратов, выделенных из них, активно используется в биологии, экологии и медицине для исследования физиологического состояния организма или выявления неблагоприятных параметров среды. Параметры свечения представителей гребневики Черного моря *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865 (*Lobata*) и *Beroe ovata* Bruguière, 1789 (*Beroida*) используются в изучении влияния токсикантов, таких, как жидкие углеводороды, полихлорированные бифенилы, тяжелые металлы. Способность к биолюминесценции автохтонного обитателя Черного моря – гребневика *Pleurobrachia pileus* (O.F. Müller, 1776) – вызывала сомнение у некоторых исследователей. Целью данной работы являлось подтверждение способности свечения данного вида и выбор оптимального времени для проведения экспериментов с ним. Было выявлено, что биолюминесцентную реакцию на механическую и химическую стимуляцию проявляют все размерные группы данного вида в любое время суток. При химической стимуляции величины энергии сигнала выше в несколько раз, чем при механической стимуляции. Выявлено, что оптимальное время для проведения биофизических исследований – период с 20:00 до 6:00, так как энергетические показатели биолюминесцентного сигнала в это время максимальны в пределах суток.

Ключевые слова: *Stenophora*, люминесценция, циркадный ритм, Черное море.

DOI: 10.31857/S0006302923040142, EDN: KМУНУХ

Способность испускать свет в результате биохимической реакции называется биолюминесценцией и, в отличие от других видов люминесценции, таких как флуоресценция, термохемилюминесценция и т.д., присуща только живым организмам, имеющим специализированный ферментативный аппарат или биосубстрат [1]. В ходе химической реакции люциферин (субстрат) окисляется с помощью молекулярного кислорода под действием люциферазы (фермента) с образованием органических пероксидных соединений, распад которых приводит к возбуждению молекул вещества, ответственных за светоизлучение [2].

Биолюминесценция встречается у эволюционно разнородных групп организмов [2–4], в том числе у некоторых бактерий, грибов, водорослей, кишечнополостных, червей, моллюсков, насекомых и рыб, но не наблюдается у более высокоорганизованных животных. Биолюминесцентные системы возникали у организмов независимо

друг от друга и не закреплялись эволюционно [2]. Это привело к тому, что ферменты и субстраты этих систем различны и сейчас известно уже о тридцати типах биолюминесцентных систем, только десять из которых хорошо изучены [5]. Кроме того, отличаются по характеру и люминесцентные структуры (фотофоры) и фотоциты – клеточные типы, ответственные за эти процессы. Это влияет на длину волны испускаемого света, которая находится в синем диапазоне у морских микроводорослей динофлагеллят, в зеленом – у желтелого зоопланктона [6] и т.д. Соответствующие этим цветам энергии фотонов составляют от 40–70 ккал на 1 эйнштейн, что значительно превышает энергию большинства биохимических реакций, в том числе и распад высокоэнергетической молекулы АТФ (7 ккал). Большинство морских биолюминесцентных организмов в природе генерируют световые вспышки в ответ на внешние, в основном, механические либо химические воздействия.

Биолюминесценция является важным элементом функционирования пелагических сообществ [3, 4, 7]. Это связано с экологической ролью света в жизни гидробионтов. Биолюминесценция используется для внутривидовой и межвидовой коммуникации, для привлечения жертвы и отпугивания хищников. Так, для фитопланктонных организмов биолюминесценция выполняет защитную функцию. Светящиеся виды микроводорослей выедаются в меньшей степени, чем несветящиеся [8]. Это также относится и к некоторым видам копепоид, например *Metridia lucens* Voesck, 1865 [9]. Кроме того, неравномерное затухание и рассеивание различных длин волн оптического спектра в водной среде снижают эффективность света на глубинах, превышающих уже первые десятки метров [10, 11]. Таким образом, ниже фотического слоя биолюминесценция может служить средством обмена информацией между гидробионтами.

В настоящее время уже выявлены зависимости временных и энергетических параметров светового излучения от физиологического состояния ряда организмов [12–14]. Выяснилось, в частности, что влияние может оказывать отклонение температуры от оптимальной для жизнедеятельности данного организма [15, 16], изменение уровня и оптического спектра освещенности [17–21], солености среды [22] и т.д. При этом, как считается, естественные колебания перечисленных факторов не являются для организма экстремальными, поскольку составляют экологическую нишу вида и определяют его популяционный гомеостаз.

Способность к биолюминесценции, обнаруженная у многих морских гидробионтов [2, 4, 18, 23], выявлена и у представителей желетелого макропланктона — гребневиков (*Stenophora*). Практически все представители гребневиков являются биолюминесцентными видами с хорошо изученными параметрами светового сигнала [6, 24]. Представители этого типа животных светятся зелеными вспышками. В этом случае стимулятором, как и у большинства кишечнорастворимых, является ион Ca^{2+} , реагирующий с люциферин-люциферазным пероксидным комплексом — экворинном.

Три вида гребневиков, играющих важную роль в экосистеме Черного моря и являющиеся доминирующими по биомассе видами, принадлежат к трем отрядам: *Lobata*, *Beroida*, *Cidippida*. Наиболее полно изучена биолюминесценция двух видов-вселенцев — *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865 (*Lobata*) и *Beroe ovata* Bruguière, 1789 (*Beroida*) [24–28]. Параметры свечения этих видов используются для оценки влияния токсических веществ на состояние организма в биофизических исследованиях [26–28]. Светимость третьего аборигенного вида — *Pleurobrachia pileus* (O. F. Müller, 1776)

(*Cidippida*), как и других видов рода *Pleurobrachia* (*Cidippida*), является спорным моментом. Так, для акватории Средиземного моря и берегов Северной Америки возможность излучать свет для *P. bachei* A. Agassiz, 1860, *P. rhodopsis* Chun, 1879 и *P. pileus* не только ставится под сомнение, но и категорически заявляется о невозможности этих видов к биолюминесценции [29]. Другие исследователи [14, 23, 30] полагают, что *P. pileus* является биолюминесцентным видом. Так, проведенные лабораторные исследования над черноморской популяцией *P. pileus* в холодное время года показали, что стимулирование химическим и механическим способом представителей этого вида вызывает биолюминесцентный отклик [30]. Таким образом, биолюминесцентный сигнал этого вида также может быть использован для анализа состояния организма при влиянии на него различных абиотических и антропогенных факторов. На данный момент многие аспекты биолюминесценции *P. pileus* не известны.

Целью данной работы являлось выявление энергетических и временных параметров биолюминесцентного сигнала и его циркадного ритма у *Pleurobrachia pileus* в летний период для выбора оптимального времени проведения исследований по влиянию различных факторов на его физиологическое состояние.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биологический материал для исследования параметров свечения *Pleurobrachia pileus* собран на 26 станциях в научном рейсе №102 НИС «Профессор Водяницкий» в период с 10.06.18 г. по 01.07.18 г. (рис. 1). Для сбора проб использовали планктонную сеть Джели (ячей 115 мкм, входное отверстие 0.1 м²) и макропланктонную сеть Богорова—Раса (ячей 400 мкм, входное отверстие 0.5 м²).

Из планктонной пробы изымали не помятые, активные экземпляры *Pleurobrachia pileus*, измеряли их и ранжировали по размеру в стеклянные стаканы емкостью 0.5–1.0 л, наполненные морской водой, взятой с поверхности на той же станции и профильтрованной через сито ячей 35 мкм. Через 1 ч после вылова объекты помещали в темное помещение. Экспозиция проводилась через 2 ч после пребывания в темноте при температуре 21°C.

Исследование параметров свечения проводили на лабораторном биофизическом комплексе «Свет» [4] методом механической и химической стимуляции отдельного объекта, помещенного в теневую камеру комплекса в кювете объемом 50 мл [14]. Приборный лабораторный комплекс «Свет» включал высоковольтный блок питания (BC-22), люминескоп, состоящий из приемника

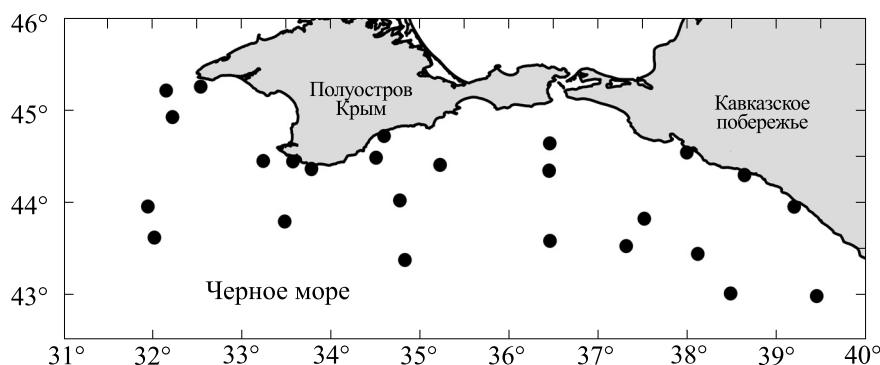


Рис. 1. Карта станций научного рейса № 102 НИС «Профессор Водяницкий», на которых выполнялся сбор *Pleurobrachia pileus* для проведения эксперимента.

светового излучения (ФЭУ-71) и темновой камеры для объекта, а также регистрирующего устройства — цифрового интерфейса.

В качестве механического стимулятора использовали морскую воду (объем 2 мл), вводимую с помощью поршневого устройства с созданием турбулентного течения жидкости в кювете. Химическую стимуляцию проводили добавлением 2 мл 96%-го этанола ламинарным течением.

Основными энергетическими параметрами биолюминесцентного сигнала являются амплитуда (A) — максимальная энергия сигнала в единицу времени отсчета, общая энергия сигнала (E) и суммарная энергия сигнала, превышающая порог 0.1 от амплитуды ($E_{0.1A}$). Временными параметрами выбраны общая длительность сигнала (L) и суммарная длительность отдельных импульсов биолюминесцентного сигнала ($l_{0.1A}$) [3, 4, 12] (рис. 2).

Были исследованы 498 объектов размером 4.0–21.0 мм (орально-аборальная длина), ранжированных на 9 размерных групп: 4.5 ± 0.5 , 6.5 ± 0.5 , 8.5 ± 0.5 , 10.5 ± 0.5 , 12.5 ± 0.5 , 14.5 ± 0.5 , 16.5 ± 0.5 , 18.5 ± 0.5 , 20.5 ± 0.5 мм. Размеры каждой особи определяли под бинокулярным микроскопом МБС-10 с точностью до 0.1 мм. Для визуального удобства в таблицах и графиках группы названы по размеру меньших в них особей в мм (размерная группа 4.5 ± 0.5 обозначена как группа 4 мм и т.д.). Исследование диапазона изменения параметров биолюминесцентного сигнала у каждой размерной группы проводили в четные часы суток: 02:00, 04:00, 06:00, ..., 24:00. Эксперименты по сравнению величин основных параметров биолюминесцентного сигнала между размерными группами проводили в утренние часы (8:00) и темное время суток (22:00).

Детально суточную динамику параметров биолюминесценции исследовали у самых многочис-

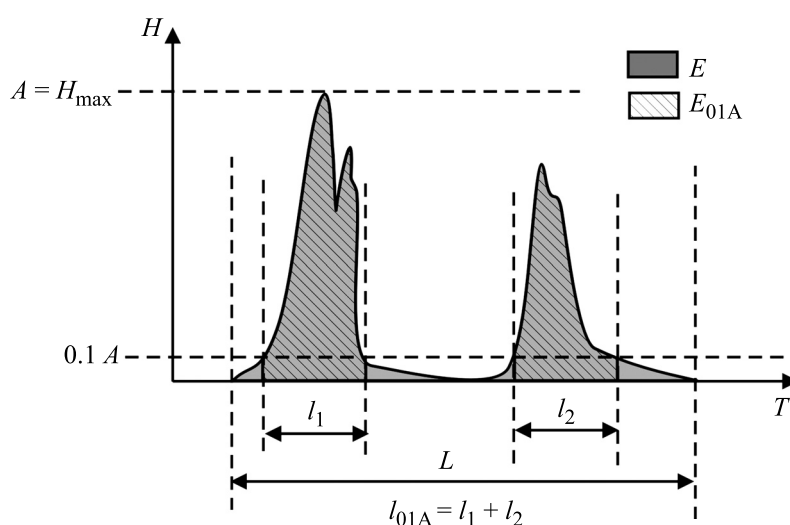


Рис. 2. Параметры биолюминесцентного сигнала.

Таблица 1. Обозначения анализируемых параметров биолюминесцентного сигнала и их расшифровка

№	Обозначение	Расшифровка
1	$A_{\text{ср.}}$	Средняя по группе одноразмерных особей амплитуда биолюминесцентного сигнала, мкВт·см ⁻²
2	$A_{\text{инд.}}$	Амплитуда биолюминесцентного сигнала отдельной особи в группе, мкВт·см ⁻²
3	$L_{\text{ср.}}$	Средняя по группе одноразмерных особей длительность сигнала, с
4	$L_{\text{инд.}}$	Длительность сигнала отдельной особи в группе, с
5	$E_{\text{ср.}}$	Средняя по группе одноразмерных особей энергия сигнала, мкВт·с·см ⁻²
6	$E_{\text{инд.}}$	Энергия сигнала отдельной особи в группе, мкВт·с·см ⁻²

ленных экземпляров размером 10 мм каждые два часа в течение 24 ч.

Для анализа полученных результатов составляли матрицы данных, вычисляли минимальные, максимальные и средние величины энергетических и временных параметров в каждой размерной группе, а также медианы амплитуд размерных групп в программе MS Excel 2007 с помощью надстройки «Анализ данных».

Расшифровка обозначений приведена в табл. 1.

Достоверность различия средних величин каждого параметра биолюминесцентного сигнала между двумя видами стимуляции оценивали путем вычисления критерия достоверности различия:

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{S_{\bar{x}_1}^2 + S_{\bar{x}_2}^2}},$$

где t — критерий достоверности различия, $\bar{x}_1$ — среднее значение параметра при механической стимуляции, $\bar{x}_2$ — среднее значение параметра при химической стимуляции, $S_{\bar{x}_1}$ — средняя ошибка значение параметра при механической стимуляции, $S_{\bar{x}_2}$ — средняя ошибка значение параметра при химической стимуляции.

Если значение $t < 2$, то различие между двумя выборками считается недостоверным, если $t \geq 2$, то различие между двумя выборками достоверно на 95%.

Расчет доверительных интервалов проводили по доверительной вероятности. Ширина доверительного интервала при доверительной вероятности 0.95 составила $1.96 \cdot S_{\bar{x}}$, где $S_{\bar{x}_1}$ — средняя ошибка значения параметра.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Форма биолюминесцентного импульса. Форма и типы биолюминесцентного сигнала у индивидуумов *P. pileus* при обоих видах стимуляции пред-

ставлены на рис 3, приведены данные для размерной группы 16 мм.

При механической стимуляции наблюдали два типа сигнала *P. pileus*, в первом случае регистрировали резкий фронт нарастания амплитуды до максимума, иногда с последующим вторым, существенно меньшим пиком, после чего шел такой же резкий краткий по времени спад (рис. 3а). Во втором случае сначала регистрировалось слабое увеличение амплитуды, низкие величины которой сохранялись некоторое время, затем импульс большой длительности со множественными пиками-вершинами (рис. 3б).

При химической стимуляции, после которой особь погибала, сигнал по форме напоминал второй упомянутый выше тип при механической стимуляции, однако без первичного слабого увеличения, амплитуда сразу достигала существенных величин, при этом последний импульс часто имел пологий и длительный фронт затухания (рис. 3в).

Четкая связь между формой импульса и размерами экземпляров не обнаружена.

Амплитуда и длительность биолюминесцентного сигнала у разноразмерных групп. Было выявлено, что величины амплитуды биолюминесцентного сигнала различаются при механическом и химическом типах стимуляции. Средняя по всем размерным группам амплитуда $A_{\text{ср}}$ при механической стимуляции колебалась от 0.2 до $1.4 \cdot 10^{-3}$ мкВт·см⁻² (табл. 1). При этом в группах с размерами 4–5 мм и 8–19 мм величина $A_{\text{ср}}$ находилась в пределах $(0.6–0.9) \cdot 10^{-3}$ мкВт·см⁻², а минимальное и максимальное значение $A_{\text{ср}}$ зарегистрированы в группе самых крупных особей и группе 6–7 мм соответственно. При химической стимуляции минимальная по группам средняя амплитуда $A_{\text{ср}}$ зарегистрирована в группе с наименьшими размерами — 1.21, максимальная — $2.26 \cdot 10^{-3}$ мкВт·см⁻² — в группе с размерами 6–7 мм. У самых крупных экземпляров амплитуда сигнала

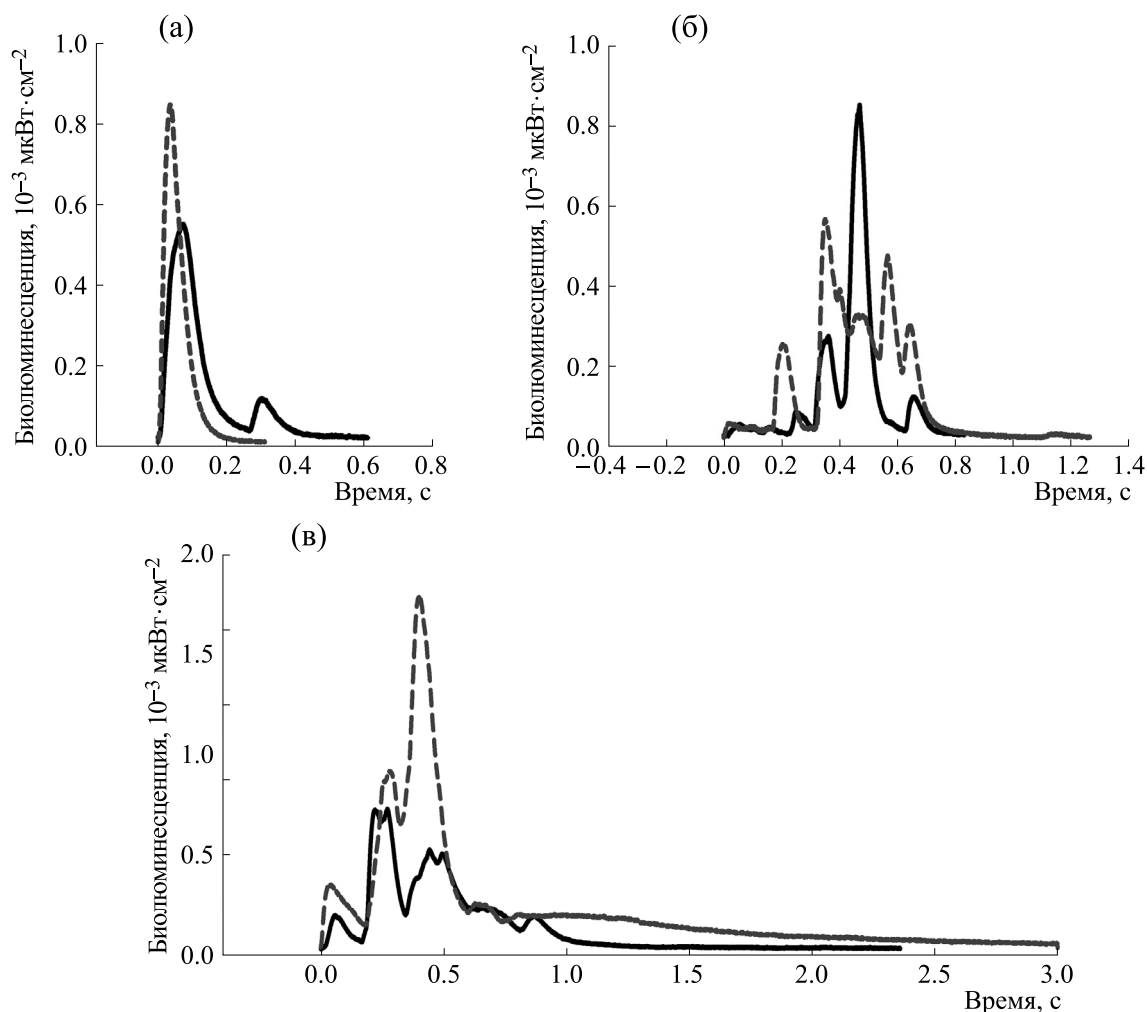


Рис. 3. Формы биолуминесцентных импульсов *P. pileus*: (а) и (б) — при механическом типе стимуляции, (в) — при химическом типе стимуляции. Сплошной и пунктирной линией обозначены разные формы сигнала для особей размером 16 мм.

у отдельных особей достигала $8.3 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{см}^{-2}$, но при наличии в группе слабо высветившихся особей средняя величина сигнала в этой группе составила $A_{\text{ср}} = 1.79 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{см}^{-2}$ (табл. 2).

Средняя для всех размерных групп длительность сигнала $L_{\text{ср}}$ при механической стимуляции варьировала от 1.3 до 2.8 с (табл. 3). Наибольшие величины средней длительности сигнала зарегистрированы у размерных групп с самыми маленькими и самыми крупными размерами, а минимальная — у группы с размерами 6–7 мм. Максимальная индивидуальная длительность сигнала зарегистрирована в группе с размерами 16–17 мм ($L_{\text{инд. max}} = 7 \text{ с}$).

При химическом типе стимуляции максимальные длительности сигнала в разных группах достигали $L_{\text{инд. max}} = 5\text{--}6 \text{ с}$, средняя по каждой размерной группе длительность $L_{\text{ср}}$ изменялась

от 1.0 с (для группы 20–21 мм) до 2.4 с (для группы 4–5 мм), во всех остальных размерных группах $L_{\text{ср}}$ составляла 1.6–1.9 с.

Энергия биолуминесцентного сигнала при механической стимуляции у разных групп слабо отличалась друг от друга (рис. 4). Минимальные значения зарегистрированы у группы самых крупных особей, наибольшие — у экземпляров размером 18–19 мм. Энергия биолуминесцентного сигнала при химической стимуляции, напротив, сильно различалась по группам. Наибольшие средние значения, выявленные у особей размером 6–7 мм, превышали минимальные, зарегистрированные у группы самых крупных *P. pileus*, в семь раз. Величины энергии биолуминесцентного отклика при химической стимуляции, за исключением группы 20–21 мм, превышали таковые при механической стимуляции в полтора-четыре раза (рис. 4).

Таблица 2. Амплитуда биолюминесцентного сигнала, $\times 10^{-3}$ мкВт см $^{-2}$

Размерная группа	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Механическая стимуляция									
Среднее, A_{cp}	0.59	1.37	0.80	0.73	0.76	0.89	0.62	0.94	0.20
Стандартная ошибка	0.09	0.18	0.11	0.07	0.09	0.09	0.08	0.20	0.03
Медиана	0.45	0.88	0.41	0.56	0.57	0.75	0.54	0.74	0.16
Максимум, $A_{инд.мах}$	1.21	4.81	3.34	2.56	2.81	2.47	1.60	2.72	0.35
Химическая стимуляция									
Среднее, A_{cp}	1.21	2.26	2.08	1.44	2.11	1.36	1.62	2.00	1.79
Стандартная ошибка	0.25	0.31	0.24	0.15	0.29	0.18	0.28	0.44	0.88
Медиана	0.94	1.63	1.38	0.84	1.32	0.77	0.91	0.99	0.31
Максимум, $A_{инд.мах}$	4.30	8.41	7.10	6.56	7.10	5.63	6.35	6.59	8.31
Критерий достоверности различия									
	2.3	2.4	4.9	4.3	4.5	2.4	3.5	2.2	1.8

Параметры сигнала у разноразмерных групп в светлое и темное время суток. Были проведены исследования параметров биолюминесцентного сигнала у разных размерных групп в утреннее время после восхода солнца (8:00) и ночное время суток (22:00).

Амплитуда биолюминесцентного сигнала у всех групп при механической стимуляции и в утреннее, и в ночное время была ниже, чем при

химической (табл. 4). Наибольшие величины амплитуды отмечены у групп с размерами 12–13 мм (утром) и 18–19 мм (ночью) при химической стимуляции.

В светлое время суток при механической стимуляции средняя по всем группам амплитуда составляла $0.8 \cdot 10^{-3}$ мкВт·см $^{-2}$, максимальная была зарегистрирована в группе 6–7 мм, и составила $1.4 \cdot 10^{-3}$ мкВт·см $^{-2}$, в этой же группе наблюдали

Таблица 3. Длительность биолюминесцентного сигнала, с

Размерная группа	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Механическая стимуляция									
Среднее, L_{cp}	2.37	1.25	1.85	1.87	1.71	1.36	2.08	1.76	2.82
Стандартная ошибка	0.51	0.18	0.25	0.23	0.26	0.21	0.41	0.44	0.87
Медиана	1.43	0.78	0.97	0.81	0.81	0.69	1.02	0.94	2.10
Максимум, $L_{инд.мах}$	5.99	4.99	5.99	5.99	5.99	5.99	6.99	5.19	5.61
Химическая стимуляция									
Среднее, L_{cp}	2.39	1.93	1.75	1.76	1.56	1.77	1.67	1.72	0.97
Стандартная ошибка	0.40	0.25	0.19	0.16	0.18	0.22	0.28	0.39	0.37
Медиана	1.79	1.27	1.14	1.33	1.07	1.16	1.15	0.95	0.54
Максимум, $L_{инд.мах}$	4.99	5.71	5.59	5.64	4.99	5.26	5.77	5.99	2.96
Критерий достоверности различия									
	0.0	2.2	0.3	0.4	0.5	1.3	0.8	0.1	2.0

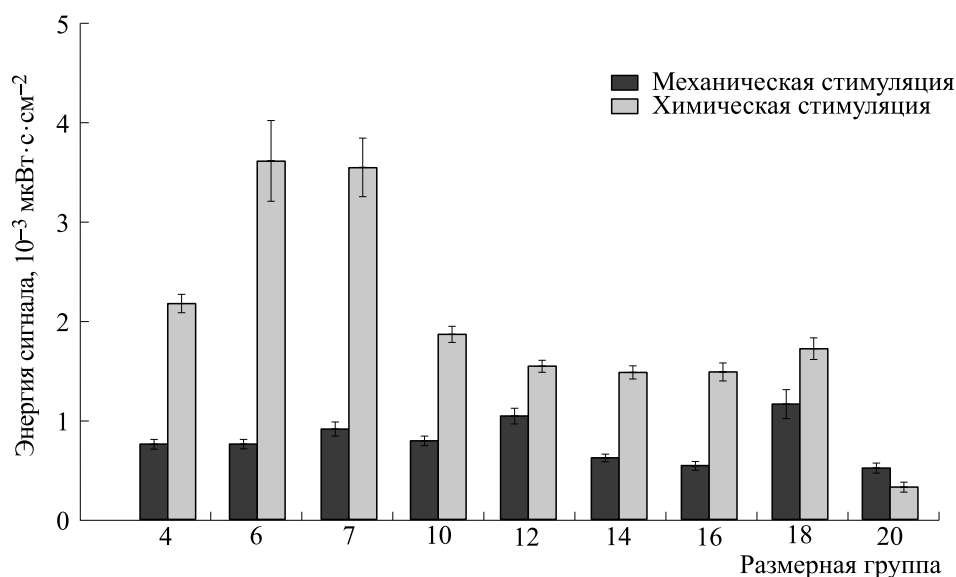


Рис. 4. Средняя энергия билюминесцентного сигнала каждой размерной группы при разных способах стимуляции.

максимальную индивидуальную амплитуду сигнала $A_{\text{инд.мах}} = 3.8 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$.

В темное время суток при механической стимуляции средняя по всем группам амплитуда бы-

ла незначительно выше утренней величины и составила $0.9 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$. Максимальная средняя и индивидуальная величины амплитуды, как и утром, зарегистрированы в группе 6–7 мм. В группе с самыми крупными экземплярами ам-

Таблица 4. Амплитуда билюминесцентного сигнала, $\times 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$

Размерная группа	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Механическая стимуляция (8 ч)									
Среднее, $A_{\text{ср}}$	0.65	1.42	0.76	0.57	1.22	0.76	1.10	—	—
Стандартная ошибка	0.02	0.12	0.05	0.02	0.05	0.03	0.00	—	—
Максимум, $A_{\text{инд.мах}}$	1.21	3.76	2.80	2.77	1.95	1.20	1.14	—	—
Механическая стимуляция (22 ч)									
Среднее, $A_{\text{ср}}$	0.45	1.54	0.76	1.04	0.84	0.53	0.43	0.83	0.33
Стандартная ошибка	0.00	0.05	0.04	0.04	0.03	0.02	0.02	0.05	0.00
Максимум, $A_{\text{инд.мах}}$	0.45	4.81	4.39	3.76	3.76	1.21	1.24	1.89	0.35
Химическая стимуляция (8 ч)									
Среднее, $A_{\text{ср}}$	1.18	1.49	1.31	1.42	2.43	1.69	1.16	—	—
Стандартная ошибка	0.03	0.07	0.04	0.03	0.12	0.02	0.10	—	—
Максимум, $A_{\text{инд.мах}}$	2.12	3.76	2.97	4.10	4.34	1.93	3.11	—	—
Химическая стимуляция (22 ч)									
Среднее, $A_{\text{ср}}$	1.41	1.96	1.48	0.79	2.15	1.13	1.63	2.27	1.57
Стандартная ошибка	0.00	0.04	0.04	0.02	0.08	0.04	0.04	0.16	0.12
Максимум, $A_{\text{инд.мах}}$	1.41	3.64	3.76	2.73	7.10	4.08	3.47	5.48	2.73
Критерий достоверности различия при разных типах стимуляции									
8 ч	16.0	0.5	8.9	22.5	9.4	26.0	0.6	—	—
22 ч	1.0	6.5	13.5	5.7	15.2	13.2	25.3	8.5	10.7

Таблица 5. Длительность биолюминесцентного сигнала, с

Размерная группа	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Механическая стимуляция (8 ч)									
Минимум, $L_{\text{инд. min}}$	0.11	0.14	0.37	0.85	0.65	0.68	0.54	—	—
Максимум, $L_{\text{инд. max}}$	4.99	2.43	5.99	6.99	4.94	5.99	1.33	—	—
Среднее, $L_{\text{ср}}$	2.24	2.32	5.05	4.80	4.63	5.47	5.96	—	—
Механическая стимуляция (22 ч)									
Минимум, $L_{\text{инд. min}}$	0.53	0.36	0.26	0.23	0.18	0.68	0.27	0.44	0.21
Максимум, $L_{\text{инд. max}}$	0.53	4.99	4.99	4.99	4.99	4.99	4.99	2.43	0.60
Среднее, $L_{\text{ср}}$	0.53	1.22	1.34	1.01	1.88	2.03	3.43	1.14	0.41
Химическая стимуляция (8 ч)									
Минимум, $L_{\text{инд. min}}$	0.03	0.02	0.03	0.04	0.02	0.13	0.01	—	—
Максимум, $L_{\text{инд. max}}$	0.21	0.38	0.30	0.41	0.43	0.19	0.31	—	—
Среднее, $L_{\text{ср}}$	0.12	0.15	0.13	0.14	0.24	0.17	0.12	—	—
Химическая стимуляция (22 ч)									
Минимум, $L_{\text{инд. min}}$	0.14	0.04	0.26	0.15	0.35	0.42	0.23	0.23	0.32
Максимум, $L_{\text{инд. max}}$	0.14	0.36	5.99	9.35	4.96	9.98	6.15	5.51	0.54
Среднее, $L_{\text{ср}}$	0.14	0.20	1.85	3.28	1.58	3.13	1.68	2.76	0.43
Критерий достоверности различия									
8 ч	0.89	2.30	0.19	1.28	0.39	1.01	2.05	—	—
22 ч	1.00	0.90	0.74	2.54	0.37	1.00	1.33	0.97	0.12

плитуда была минимальной по сравнению с другими размерными группами.

При химическом типе стимуляции утром и ночью средняя по группам амплитуда составляла $1.5 \cdot 10^{-3}$ мкВт·с·см⁻², максимальные величины при этом наблюдались в размерной группе 12–13 мм.

Таким образом, при химической стимуляции ночью зарегистрированы более высокие величины индивидуальной амплитуды, чем в утреннее время, однако на средних величинах это не отразилось, и они были равны утренним, либо ниже их.

Средняя длительность сигнала по всем группам утром при механическом типе стимуляции составляла 3.1 с (максимум отмечен в группе с размерами 8–9 мм — 4.5 с). При химическом типе стимуляции средняя длительность составляла 3.3 с, максимальная среди особей длительность сигнала также зарегистрирована в группе с размерами 8–9 мм ($L_{\text{инд. max}} = 11.9$ с), а максимальная средняя по группе длительность отмечена для размеров 16–17 мм (табл. 5).

Почти для всех групп утром длительность сигнала значительно (в два-четыре раза) превышала таковую в ночное время как при механической стимуляции, так и при химической (табл. 5).

В ночное время при механическом типе стимуляции средняя по всем группам длительность

сигнала составляла 1.6 с, при этом максимальные величины наблюдали в группе с размерами 16–17 мм, средняя длительность в которой составила 3.4 с, максимальная индивидуальная — 5 с. При химическом типе стимуляции средняя по группам длительность сигнала составляла 2.14 с. Максимальная длительность биолюминесцентного сигнала отдельных индивидуумов $L_{\text{инд. max}}$ ночью достигала 5 и 10 с при механической и химической стимуляции, соответственно; в среднем по группам максимумы зарегистрированы для групп с размерами 14–17 мм.

Средняя энергия сигнала в утреннее время при механической стимуляции составляла $1.0 \cdot 10^{-3}$ мкВт·с·см⁻², при этом максимальные величины отмечены в группах с размерами 8–11 мм (рис. 5а). Величины энергии сигнала при химической стимуляции были значительно выше, чем при механическом типе стимуляции. Средняя по группам энергия при химической стимуляции утром составила $3.1 \cdot 10^{-3}$ мкВт·с·см⁻², а максимальная индивидуальная энергия сигнала, зарегистрированная в группе с размерами 8–9 мм, — $22.6 \cdot 10^{-3}$ мкВт·с·см⁻² (средняя по этой размерной группе составила $4.9 \cdot 10^{-3}$ мкВт·с·см⁻² и также была максимальной среди средних других размерных групп (рис. 5б)).

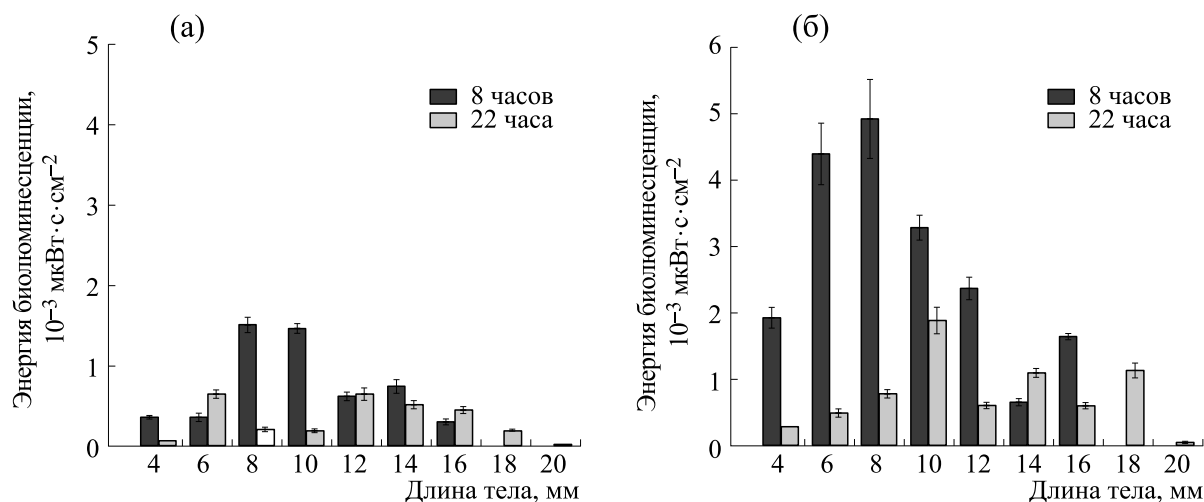


Рис. 5. Средняя энергия биоломисцентного сигнала утром (8:00) и ночью (22:00) при различных видах стимуляции: (а) – механической, (б) – химической.

В ночное время энергия сигнала была ниже, средняя величина при механической стимуляции составила $0.4 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$, а максимальная отмечена в группе 12–13 мм (средняя энергия сигнала составила $0.7 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$, индивидуальная достигала $3.7 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$).

При химической стимуляции средняя энергия сигнала $E_{\text{ср}}$ ночью также была ниже, чем в 8 часов утра, и в итоге средняя по группам величина составила $1.0 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$.

Длительность и энергия сигнала ночью в большинстве размерных групп были ниже утренних величин, эта закономерность нарушалась иногда лишь для групп с размерами 14–17 мм.

Суточная динамика параметров биоломисценции у группы размером 10 мм. Детально суточную динамику параметров биоломисценции исследовали у экземпляров размерами 10 мм, эксперименты по высвечиванию проводили каждые два часа в течение 24 ч. Было выявлено, что при механическом типе стимуляции амплитуда биоломисцентного сигнала достигала наибольших значений в период с 18:00 до 6:00, в это время ее средние величины достигали $A_{\text{ср}} = 0.9$ – $2.9 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$, а индивидуальные – $A_{\text{инд} \cdot \text{max}} = 4.3 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$. Максимум $A_{\text{ср}}$ зарегистрирован в 2:00 (рис. 5) и составлял $3.0 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$.

Суточная динамика длительности сигнала в основном находилась в противофазе с изменениями амплитуды, так, высоким величинам амплитуды соответствовали низкие величины длительности, и наоборот, при минимальных амплитудах отмечались максимальные величины длительности сигнала (рис. 6). Высокие величины при меха-

нической стимуляции регистрировали с 04:00 до 16:00, длительность сигнала отдельных особей в эти часы достигала 5–7 с. Средняя длительность сигнала в течение суток составляла 2 с.

При химическом типе стимуляции в течение суток средние величины амплитуды в основном были выше, чем при механическом типе, наибольшие величины зафиксированы в 06:00, 10:00 и в полночь (3.0 – 3.8) $\cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$, амплитуда отдельных экземпляров достигала $6.6 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$ (в 24:00).

Наибольшие величины длительности сигнала при химической стимуляции отмечены в 8:00 и 22:00 (у отдельных индивидуумов достигая 8.0–9.4 с), а среднее время составило 2.26 с. Как и при механической стимуляции, суточная динамика длительности сигнала в основном находилась в противофазе с изменениями амплитуды. С 18:00 до 02:00 длительность превышала таковую при механическом типе стимуляции.

Средняя энергия биоломисцентного сигнала в течение суток при механической стимуляции составляла $0.7 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$, при химической – $1.7 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$. Максимальная индивидуальная энергия при механической стимуляции составляла $6.0 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$ и зарегистрирована в 18:00, при химической – $14.0 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$ (в 22:00).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на утверждения об отсутствии биоломисценции у *P. pileus* [29], для Черного моря ранее было показано, что особи размером 7–9 мм являются биоломисцентными, по крайней мере, в холодный сезон [30].

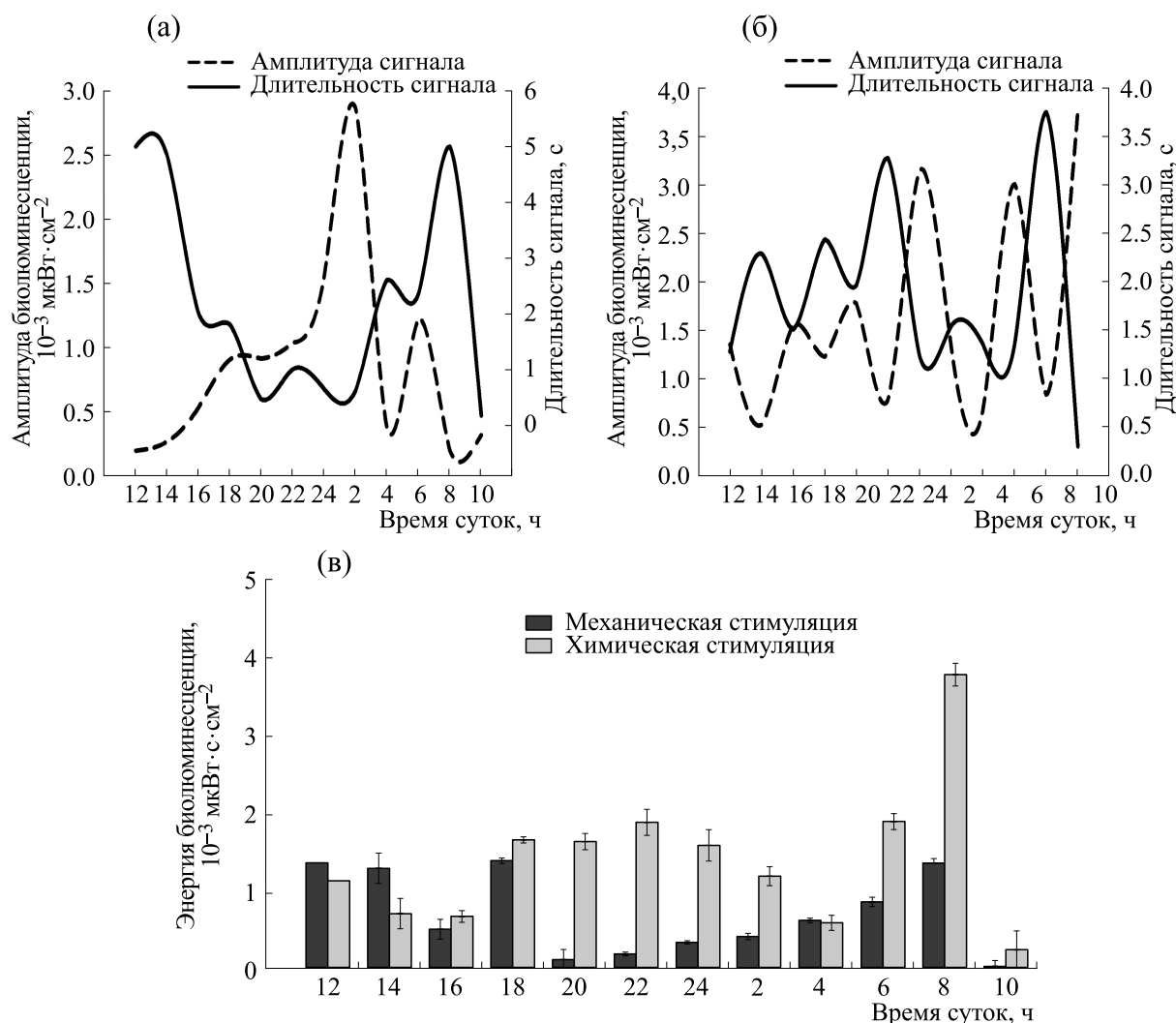


Рис. 6. Суточная динамика средних по исследуемой размерной группе (длина тела 10 мм) величин амплитуды и длительности при механической (а) и при химической (б) стимуляции; энергии (в) при механическом и химическом типе стимуляции.

По нашим данным, в летний сезон наблюдалось три типа биOLUMИНЕСЦЕНТНОГО сигнала *P. pileus*, первые два регистрировали при механической стимуляции, третий — при химической (см. рис. 3), Форма сигналов отличалась от такового у других представителей ктенофор — *B. ovata* и *M. leidy*. Так, биOLUMИНЕСЦЕНТНЫЙ сигнал при механической стимуляции у *P. pileus* представлял собой один или несколько объединенных четко выраженных импульсов (рис. 3а,б), у других видов гребневиков импульсы слиты в единый сигнал, выглядящий как острые зубцы гребенки, с постепенным нарастанием до максимального значения и спадом. При химической стимуляции у *P. pileus* последний импульс часто имел, в отличие от *B. ovata*, пологий и длительный (1.5–2.5 с) фронт спада. У *M. leidy* при химической стимуляции могли появляться дополнительные импульсы после небольшой паузы (0.1–0.5 с), по форме

они походили на первый импульс, хотя интенсивность излучения у них была в несколько раз меньше.

Анализируя параметры биOLUMИНЕСЦЕНЦИИ *P. pileus* в дневное и ночное время, можно заметить, что при механической стимуляции практически нет отличий в значениях амплитуды и явной зависимости длительности сигнала от размера особи. При химической стимуляции наблюдается слабый рост этих параметров при увеличении размера особи. В темное время суток (22:00) выявлен незначительный спад значений амплитуды при механической стимуляции и рост длительности сигнала при увеличении размера особи.

В результате наших экспериментов выявлено, что среди групп с разными размерами и возрастом особей максимальная амплитуда биOLUMИНЕСЦЕНТНОГО сигнала, как индивидуальная, так и

средняя по группе, при механической и химической стимуляции отмечена в размерной группе 6–7 мм. Что касается длительности сигнала, максимальные величины отмечены у самых маленьких (4–7 мм) и самых крупных (16–21 мм) особей. Это позволяет выбрать эти размерные группы для проведения экспериментальных исследований по влиянию токсических веществ.

В суточной динамике амплитуды замечена следующая закономерность: при механической стимуляции в темное время суток (с 18:00 до 6:00) и при химической стимуляции с 20:00 до 10:00 отмечаются повышенные величины, максимумы регистрировали с 22:00 до 02:00 при механической и в полночь при химической стимуляции. Таким образом, оптимальным временем (при постоянной температуре 21°C на всех этапах эксперимента) в летний сезон для проведения экспериментальных работ по воздействию на физиологическое состояние вида с использованием анализа параметров биолюминесцентного отклика является темное время суток с 20:00 до 6:00.

Сравнивая значения основных параметров биолюминесцентного сигнала *P. pileus* с *B. ovata* [14, 20] и *M. leidy* [14], можно заметить сходство в суточной динамике амплитуды биолюминесцентного сигнала. Так, у *B. ovata* минимум приходится на 10:00, а максимум — на 01:00, у *M. leidy* минимум выпадает на 7:00–10:00, а максимум на 13:00 и 01:00, что соответствует и минимуму, и максимуму в значениях амплитуд у *P. pileus*.

На данный момент для Черного моря список биолюминесцентных насчитывает 8 видов бактериопланктона родов *Vibrio* и *Photobacterium*, 36 видов фитопланктона (родов *Ceratium*, *Gonyaulax*, *Lingulodinium*, *Noctiluca*, *Protoperidinium* и *Pyrocystis*) и 9 видов зоопланктона [4]. Биолюминесценция большинства видов зоопланктона для Черного моря подтверждена визуально, инструментально получены результаты только для гребневиков. Сравнивая параметры биолюминесценции одиночного экземпляра *P. pileus* и исследованных ранее биолюминесцентных [4], можно увидеть, что амплитуда биолюминесцентного сигнала этого вида — $(0.8–4.3) \cdot 10^{-3}$ мкВт·см⁻² — близка к амплитуде *Noctiluca scintillans* (Macartney) Kofoed & Swezy, 1921 (до $4 \cdot 10^{-3}$ мкВт·см⁻²) и некоторым видам рода *Protoperidinium* ($(1.1–2.5) \cdot 10^{-3}$ мкВт·см⁻²), но превосходит на один-два порядка остальные виды фитопланктона, на семь порядков выше значения амплитуды бактерий ($4.95 \cdot 10^{-10}$ мкВт·см⁻² у *Vibrio indicus*) и на два-три порядка меньше, чем у других гребневиков (до 1.0 мкВт·см⁻² у *M. leidy*).

Виды *B. ovata* и *M. leidy* активно используются в экспериментальных биофизических исследованиях по выявлению влияния токсических веществ на организм [26–28]. *P. pileus* также широко

представлена в Черном море и встречается не только в глубоководных слоях [31], но и в бухтах и на небольших глубинах [32], тем самым доступ к особям данного вида не затруднен, что позволяет его использовать в экспериментах. Размеры *P. pileus* позволяют исследовать влияние различных факторов на биолюминесценцию всех размерных групп этого вида, в то время как проведение исследований с особями *B. ovata* и *M. leidy* более 60 мм затруднено инструментально.

ВЫВОДЫ

Было выявлено, что биолюминесцентную реакцию *P. pileus* в летнее время на механическую и химическую стимуляцию проявляют все размерные группы данного вида. В летний сезон при химическом типе стимуляции в среднем у всех размерных групп амплитуда была выше примерно в два раза, чем при механическом. Наибольшие значения амплитуды биолюминесцентного сигнала выявлены у особей размера 6–7 мм. Наибольшая длительность зарегистрирована у особей *P. pileus* размером 4–7 и 16–21 мм. Величины амплитуды биолюминесцентного сигнала в темное время суток выше, чем в утреннее время. На основании полученных результатов можно заключить, что биолюминесценцию вида *P. pileus* можно использовать в исследованиях влияния различных факторов на физиологию организма. Оптимальным временем проведения экспериментов в летнее время является период с 20:00 до 6:00. Уровень биолюминесцентного сигнала отдельной особи *P. pileus* ниже, чем у гребневиков-вселенцев Черного моря *B. ovata* и *M. leidy*, на один-два порядка и сравнима с некоторыми представителями динофлагеллят, такими, как *Noctiluca scintillans* и некоторыми видами рода *Protoperidinium*, но при этом значительно выше, чем у остальных светящихся видов фитопланктона Черного моря.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках темы Государственного задания № 121041400077-1 «Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом». Проведенные исследования были выполнены в Центре коллективного пользования «НИС Профессор Водяницкий» Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. И. Журавлев, В. А. Веселовский и Н. Н. Кощенко, Труды МОИП, **21**, 19 (1965).
2. S. H. D. Haddock, M. A. Moline, and J. F. Case, *Annu. Rev. Mar. Sci.*, **2** (1), 443 (2010).
3. J. G. Morin, *Bull. Marine Sci.*, **33** (4), 787 (1983).
4. Ю. Н. Токарев, *Основы биофизической экологии гидробионтов* (ЭКОСИ-Гидрофизика, Севастополь, 2006).
5. O. Shimomura, *Bioluminescence: chemical principles and method* (World Scientific, 2012).
6. S. H. D. Haddock and J. F. Case, *Marine Biol.*, **133**, 571 (1999).
7. Э. П. Битюков, В. И. Василенко, И. М. Серикова и др., *Экология моря*, **46**, 19 (1996).
8. W. E. Esaias and H. C. Curl, *Limnol. Oceanogr.*, **17** (6), 901 (1972).
9. С. А. Пионтковский и С. А. Серегин, *Поведение копепода* (ЭКОСИ-Гидрофизика, Севастополь, 2006).
10. В. Б. Цейтлин и Ю. А. Рудяков, Докл. АН СССР, **38** (4), 978 (1989).
11. E. Pennisi, *Science*, **235** (3), 1060 (2012).
12. П. В. Евстигнеев, в сб. *Биологические ресурсы водоемов в условиях антропогенного воздействия* (Наук. думка, Киев, 1985), сс. 29–31.
13. Э. П. Битюков, П. В. Евстигнеев и Ю. Н. Токарев, *Гидробиол. журн.*, **29** (4), 27 (1993).
14. Ю. Н. Токарев, П. В. Евстигнеев и О. В. Машукова, *Планктонные биолюминесцентные Мирового океана: видовое разнообразие, характеристики светового излучения в норме и при антропогенном воздействии* (Нижняя Ореанда, Симферополь, 2016).
15. P. V. Tett, *J. Mar. Boil. Ass. UK*, **49** (1), 245 (1969).
16. Ю. Н. Токарев, Дис. ... канд. биол. наук (ИнБЮМ, Севастополь, 1990).
17. Э. П. Битюков, Зоол. журн., **47**(1), 36 (1968).
18. И. И. Гительзон, Л. А. Левин, Р. Н. Утюшев и др., *Биоллюминесценция океана* (Гидрометеиздат, СПб., 1992).
19. П. В. Евстигнеев и Э. П. Битюков, *Экология моря*, **24**, 87 (1986).
20. О. В. Машукова, *Экология моря*, **79**, 15 (2009).
21. О. В. Машукова, в сб. *Экологические проблемы Азово-Черноморского региона и комплексное управление прибрежной зоной: Материалы молодежной научно-практической конференции* (ЭКОСИ-Гидрофизика, Севастополь, 2014), сс. 89–94.
22. П. В. Евстигнеев, *Экология моря* **42**, 31 (1992).
23. E. N. Harvey, *Bioluminescence* (Acad. Press, N.-Y., 1952).
24. Ю. Н. Токарев, О. В. Машукова и В. И. Василенко, *Экология моря*, **76**, 61 (2008).
25. Yu. N. Tokarev and O. V. Mashukova, *Luminescence*, **14**, 351 (2016).
26. O. Mashukova, Y. Tokarev, and E. Skuratovskaya, *Ecol. Montenegrina*, **14**, 109 (2017).
27. О. В. Машукова и М. И. Силаков, Труды Карадагской научной станции им. Т. И. Вяземского – природного заповедника РАН, **4** (16), 58 (2020).
28. О. В. Машукова, М. И. Силаков, Л. В. Малахова и др., *Системы контроля окружающей среды*, **3** (45), 39 (2021).
29. S. H. D. Haddock and J. F. Case, *Biol. Bull.*, **189** (3), 356 (1995).
30. О. В. Машукова, *Вестн. Прикаспия*, **3** (22), 15 (2018).
31. E. Mutlu and F. Bingel, *Marine Biol.*, **135**, 589 (1999).
32. М. Е. Виноградов, М. В. Флинт и Э. А. Шушкина, в сб. *Современное состояние экосистемы Черного моря* (Наука, М., 1987), сс. 172–186.

Bioluminescence of Ctenophore *Pleurobrachia pileus* (O. F. Müller, 1776) in the Summer Period

A.V. Temnykh*, M.I. Silakov*, and O.V. Mashukova*

*A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, prosp. Nakhimova 2, Sevastopol, 299001 Russia

The capability of bioluminescence has been found in many marine hydrobionts, including almost all representatives of the phylum Ctenophora. The glow of species and bioluminescent substrates isolated from them is actively used in biology, ecology, and medicine to study the physiological state of an organism or to identify unfavorable environmental parameters. The parameters of luminescence of the Black Sea ctenophores *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865 (Lobata) and *Berce ovata* Bruguière, 1789 (Beroida) are used to study the effects of toxicants, such as liquid hydrocarbons, PCBs, and heavy metals. Some researchers casted doubt on the capability of the Black Sea autochthonous inhabitant, ctenophore *Pleurobrachia pileus* (O. F. Müller, 1776) to produce bioluminescent light. The objective of this work was to ensure scientific support for the light-producing ability of species under study and to choose the optimal time for conducting experiments on the factors that affect bioluminescence. It was found that mechanical and chemical stimulation triggered a bioluminescent response in all size groups of species under study at any time of day. Upon chemical stimulation of the studied species, the signal energy value was several times greater than that observed after mechanical stimulation. It was revealed that the optimal time interval for conducting biophysical research is the time from 8 pm to 6 am, because the values of luminescence activity are the greatest in this time interval within a day.

Keywords: *Ctenophora*, luminescence, circadian rhythm, the Black Sea