

УДК 591.148.1:577.472(26)

П.В. ЕВСТИГНЕЕВ<sup>1</sup>, В.П. ЕВСТИГНЕЕВ<sup>2</sup><sup>1</sup>Ин-т биологии южных морей им. А.О. Ковалевского,

Украина, 99011 Севастополь, пр. Нахимова, 2

<sup>2</sup>Севастопольский национальный технический ун-т, кафедра физики,

Украина, 99053 Севастополь, студгородок

**СПОНТАННАЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ *NOCTILUCA SCINTILLANS* SUR. (*DINOPHYTA*)**

Исследовано спонтанное светоизлучение клеток *Noctiluca scintillans* Sur. в чистой морской воде и при добавлении токсиканта. Установлено, что частота микровспышек зависит от концентрации клеток и не связана только с механическими контактами. При внесении различных доз токсиканта появляется низкоуровневое осциллирующее свечение, период осцилляций которого зависит от концентрации токсиканта и времени экспозиции.

**Ключевые слова:** спонтанная биолюминесценция, *Noctiluca scintillans*, динофитовые водоросли, токсикант, осцилляции.

**Введение**

Исследования биолюминесценции моря в последние 30 лет претерпели качественные изменения, в первую очередь связанные с прогрессом в области совершенствования светорегистрирующих датчиков и вычислительной техники. Практическое значение этих работ имеет ряд аспектов, в том числе и экологический. Доказано, что уникальными сенсорными системами, фактически моментально (безинерционно) реагирующими на присутствие в среде загрязняющих веществ, являются бактерии и другие люминесценты. Для анализа используют живые организмы и выделенные из них люциферазные составляющие (Гительзон и др., 1969; Евстигнеев, 1990; Noarl ..., 1990).

Под термином спонтанная биолюминесценция понимают ее естественный фон в культуре биолюминесцирующих видов и непосредственно *in situ*. Причиной возникновения фона считается механический контакт организмов между собой и со стенками экспериментальных сосудов (Hastings, Sweeney, 1958; Biggley et al., 1969; Tett, 1979; Бозин, Филимонов, 1985) или при турбулентии. Однако сотрудники Кембриджской биологической лаборатории (Krasnow et al., 1982) с помощью компьютерного анализа показали, что спонтанное сияние низкого энергетического уровня в культуре *Gonyaulax polyedra* не всегда является суммированием микровспышек, с одной стороны, и что отдельные вспышки на фоне глау (свечения) могут не являться эффектом механических соударений клеток водорослей, как между собой, так и со стенками сосуда, – с другой. Попытка найти закономерность в последовательности отдельных вспышек и уровня глау не дала положительных результатов. Таким образом, вопрос о причинах спонтанной биолюминесценции в культурах динофитовых можно считать открытым.

©П.В. Евстигнеев, В.П. Евстигнеев, 2005

В настоящей работе приводятся результаты экспериментальных исследований о характере спонтанной реакции биолюминесценции перидиниевых водорослей на повреждающее воздействие загрязнения. Сделана попытка доказать, что использование оценки глоу более эффективно по чувствительности и быстродействию в сравнении с уже зарекомендовавшими себя методами использования индуцированной биолюминесценции.

### Материалы и методы

Эксперименты проводили в январе-апреле 1985 г. Пробы планктона собирали тотальными ловами сетью Джеди с глубины 50-0 м из прибрежной части Черного моря. В лаборатории в затемненном помещении из пробы отбирали чашками Бовери перидиниевую водоросль *Noctiluca scintillans* Sur., которая всплывала к поверхности, что облегчало ее сбор. Под бинокляром из кристаллизаторов с отсаженным материалом отбирали случайно попавшие организмы других систематических групп водорослей и зоопланктона. Пробу ночесветки, изолированную от других организмов, выдерживали в течение 1 ч в темном помещении для адаптирования к освещенности и температуре (15 °C). Затем в чашки Бовери объемом 30 мл вносили необходимое количество клеток ночесветки, после чего пробу сразу помещали под фотоумножитель (ФЭУ-29).

Фототок, возникающий при генерации света организмами, регистрировали с помощью самописца КСП, скорость протяжки бумаги которого составляла 10 мм мин<sup>-1</sup>.

В качестве токсического соединения использовали сульфат меди  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в концентрациях 0,1; 1,0; 10,0 и 50 мг л<sup>-1</sup>, разведенной в морской воде непосредственно перед внесением в нее тестовых организмов.

### Результаты и обсуждение

Особенностью экспериментов с *Noctiluca scintillans* является то, что при отсутствии перемешивания и турбулентных потоков, имеющих в море, клетки через некоторое время (до 20 мин) всплывают на поверхность, образуя скопления в виде рыжеватых пятен. Всплытие клеток ночесветки обусловлено их плавучестью из-за наличия включений жира (Битюков, 1969), а динамичность процесса приводит к столкновениям клеток друг с другом. Однако подсчет нами частоты пиков (вспышек) в единицу времени в первые и последующие минуты экспозиции пробы показывает, что в свежепривезенной пробе число отдельных вспышек в первые минуты не увеличивается. Этого можно было бы ожидать, если предположить, что источником их генерации может служить механическая стимуляция вследствие механических взаимодействий с другими организмами и стенками сосуда.

В результате анализа скользящей средней частоты спонтанных вспышек в аликвоте объемом 30 мл, содержащей 150 клеток *N. scintillans*, установлено, что средняя величина ее колеблется в пределах 3-4 вспышек в минуту и не связана с процессом тактильных взаимодействий типа "клетка-клетка" и "клетка-кювета". В случае воздействия токсического фактора заметно увеличивается частота таких вспышек преимущественно в первые моменты экспозиции, причем возрастание их

частоты зависит от концентрации токсиканта. На рис. 1 (кривые 2-5) показана количественная связь между частотой вспышек и концентрацией сульфата меди. Характерно, что при высоких концентрациях катионов  $\text{Cu}^{2+}$  появившаяся вспышка в виде искрящегося свечения исчезает в первые минуты. Попытка вызвать светоизлучение отдельных клеток ночесветки каким-либо другим способом (химическим, электрическим, механическим раздражением) после исчезновения спонтанного излучения не дает положительных результатов.

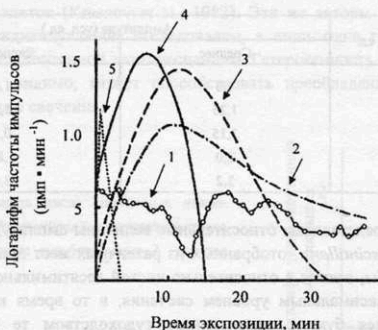


Рис. 1. Зависимость частоты микровспышек группы клеток *Noctiluca scintillans* Sur. от времени экспозиции в среде, содержащей  $\text{CuSO}_4$ : 1 — контроль, 2 — 0,1; 3 — 1,0; 4 — 10,0; 5 — 50,0 мг л<sup>-1</sup>.

С увеличением количества клеток возрастает число спонтанных вспышек. Общее их число в течение часовой экспозиции позволило получить логарифмированную прямую, представленную на рис. 2. Аналогичная высокая степень корреляции ( $r = 0,9$ ) получена также между общим количеством люминесцирующих динофлагеллят и уровнем спонтанной биолюминесценции в планктоне Японского моря (Бозин, Филимонов, 1985).

Интерпретировать эти факты с целью определения причины возникновения спонтанных вспышек в популяции ночесветки затруднительно. Так, Р. Краснов с соавт. (Krasnov et al., 1982) указывает, что одиночные клетки по-разному вели себя при экспозиции, причем 75 % их общего числа были вспышки без стимулирования. В наших экспериментах также отмечено, что клетка, изолированная от всей популяции и локализованная в центре чашки Бювера, у поверхности давала вспышку без всяких видимых раздражителей. Повторная проверка под бинокляром после регистрации вспышки показала отсутствие механической связи клетки со стенками или дном сосуда. В качестве дублирующего эксперимента в кюветы, содержащие по 50 клеток ночесветки в 30 мл воды, добавляли от 1 до 7 активно плавающих копепоид *Calanus helgolandicus*, с размерами 5-7 мм. Сравнение числа отмеченных во всех случаях спонтанных вспышек не показало достоверных различий. Таким образом, можно предположить, что источником искрящегося свечения в культуре динофитовых

водорослей может быть не только тактильное взаимодействие, но и факторы иного происхождения.

Анализ амплитуды вспышек, возникающих спонтанно, показывает, что она, вероятно, не зависит от количества клеток (табл. 1). Нами также выявлена связь энергии спонтанного свечения со степенью загрязнения воды.

Таблица 1. Зависимость величины амплитуды спонтанных вспышек клеток *Noctiluca scintillans* Sur. от их количества

Количество клеток, ед.	Амплитуда (усл. ед.)	
	Среднее	Дисперсия
5	1,0	1,2
15	1,25	1,2
75	3,15	0,5
150	2,0	1,84
300	3,2	3,6

В табл. 2 представлены относительные величины амплитуды спонтанных вспышек клеток *N. scintillans*, отобранных из различных мест прибрежной части Черного моря. Пробы, взятые в относительно чистой десятимильной зоне Крыма, характеризуются максимальным уровнем свечения, в то время как в одной из глубоко врезающихся бухт с интенсивным судоходством те же организмы обладают на порядок меньшей энергией спонтанной биолюминесценции.

Таблица 2. Зависимость величины амплитуды спонтанных вспышек клеток *Noctiluca scintillans* Sur. от степени загрязнения среды (комплексного)

Район сбора проб	Количество клеток, ед.	Амплитуда (усл. ед.)	
		среднее	дисперсия
Южная бухта	75	2,24	4,73
Арт. бухта	150	13,2	40,8
Центр бухты, фарватер	150	16,7	48,2
5 миль от берега	150	21,4	13,6
10 миль от берега	150	32,4	13,7

Одной из особенностей спонтанного светоизлучения культур водорослей из отдела *Dynophyta* является наличие низкоуровневого свечения, с трудом различаемого глазом и, предположительно, не связанного со вспышками, отмеченными выше (Biggley et al., 1969; Krasnov et al., 1982). В наших экспериментах ни в одной из свежевзятых проб данный вид излучения (глоу) не был зафиксирован. Однако при последующей экспозиции он появлялся. Минимальное время экспозиции для возникновения такого свечения в условиях затемнения и температуре 15 °С в наших опытах составляло 25 ч. При воздействии токсического агента низкоуровневое свечение появлялось всегда одновременно в случае контакта популяции и токсиканта. Это подтверждает связь возникновения глоу с каким-либо повреждающим воздействием. В качестве последнего можно

рассматривать катионы меди, а также низкую температуру (+4 °C), которая также вызвала появление глос. Как известно (Nordly, 1957), культуры гетеротрофных динофлагеллят крайне нестабильны во времени и при попытках культивирования деградируют и погибают. Возможно, спонтанное низкоуровневое свечение сопровождается деградацию клеток. Однако в ряде экспериментов с *Noctiluca scintillans* появление фона в течении 2 недель экспозиции при прочих равных условиях мы не фиксировали.

В работе Р. Краснова с соавт. такое свечение наблюдалось без повреждения клеток (Krasnov et al., 1982). Эти же авторы отмечали, что не все клетки при индивидуальном исследовании, а лишь одна треть их числа имела указанный вид спонтанной люминесценции. Гетерогенность клеток *N. scintillans* в эксперименте, видимо, может способствовать преобладанию искрящегося или низкоуровневого свечения.

Рис. 2. Зависимость числа спонтанных микровспышек *Noctiluca scintillans* Sur. от численности ее клеток. 1 — наличие сульфата меди; 2 — чистая морская вода.

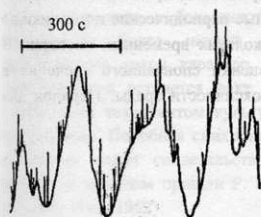
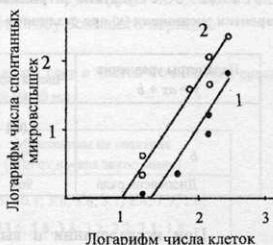


Рис. 3. Аналоговая запись осциллирующего спонтанного свечения *Noctiluca scintillans* Sur. (150 кл.).

На рис. 3 представлена аналоговая запись низкоуровневого свечения (глю) в популяции из 150 клеток, содержащихся в чистой морской воде без подкормки в течение 1 суток. Особенностью такого свечения является осциллирующий характер интенсивности светового потока, при этом показатели осцилляции достаточно упорядочены.

Аналогичные колебания интенсивности сигнала наблюдаются при добавлении токсических соединений. С увеличением концентрации токсиканта в

среде уменьшается интенсивность их амплитуды вплоть до полного исчезновения. В табл. 3 представлены параметры линейной регрессии и дисперсия энергии биолюминесценции для спонтанного светоизлучения популяций ночесветки, содержащейся в различной среде. Как видно, при времени экспозиции 1 сут наивысшая дисперсия глау наблюдается в чистой воде. При попадании токсиканта в свежееотобранную группу клеток ночесветки дисперсия свечения возрастает пропорционально концентрации токсиканта. Средний уровень такого глау наивысший в чистой воде после суточной экспозиции, а также при максимальной концентрации токсиканта, о чем свидетельствует свободный коэффициент уравнения ( $\delta$ ). Показатель углового тренда процесса указывает на практическое его отсутствие (незначительность) как в чистой воде, так и при небольшом загрязнении ( $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ).

Таблица 3. Результаты регрессионного анализа записи амплитуды спонтанного глау от времени экспозиции ( $x$ ) при различном уровне интоксикации

Параметры уравнения $y = ax + b$	Чистая вода	Содержание $\text{CuSO}_4$ , $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1}$		
		0,1	1,0	50
$a$	0,051	0,01	0,1	0,21
$b$	73,6	2,01	12,7	19,04
Дисперсия ряда	960	4,1	23,2	73,9

При исследовании и выявлении наиболее характерных периодических составляющих подобных пульсаций использовали спектральную оценку по методу максимальной энтропии (Дворянинов и др., 1987). Типичный спектр процесса спонтанного глау представлен на рис. 4. Распределение дисперсии интенсивности свечения во времени указывает на существование ряда неоднородностей от единиц минут до их десятков. Иными словами, достоверные периодические гармоники во флуктуациях спонтанного глау имеются на нескольких временных частотах. В табл. 4 приведены результаты спектральной оценки спонтанного свечения в популяциях ночесветки с различной степенью токсичности среды. Порядок для расчета данной модели соответствовал 24.



Рис. 4. Зависимость спектральной плотности излучений *Noctiluca scintillans* Sur. от периода осцилляций.

При обсуждении этих результатов следует обратить внимание на увеличение периодов флуктуаций при повышении концентрации токсиканта (табл. 4), однако простая суточная экспозиция группы клеток в чистой морской воде также вызывает появление низкочастотной составляющей (получасовой период) глоу.

Еще одной характерной чертой динамики глоу является увеличение периода осцилляций интенсивности спонтанного глоу с увеличением времени экспозиции как в чистой, так и в загрязненной среде. На 7-10-е сут период низкочастотных пиков может увеличиваться в 1,5-2 раза по сравнению с начальными этапами при наличии всего остального спектра флуктуаций. Повторяемость отмеченных выше закономерностей на протяжении всех проведенных экспериментов дает возможность приблизительно оценить время экспозиции или степень токсического поражения культуры ночесветок по отсутствию или наличию колебаний интенсивности глоу большого периода.

Таблица 4. Основные периоды флуктуаций спонтанного глоу в чистой и токсичной среде при концентрации клеток *Noctiluca scintillans* Sur. 150 экз. на 30 мл

Концентрация токсиканта, мг · л <sup>-1</sup>	Максимумы на спектрах (мин от начала экспозиции)
100	37.5; 10.7; 5.8; 3.8; 3.1; 2.4; 1.7; 1.6;
10	13.6; 5.8; 3.8; 3.2; 2.7; 2.1; 1.8;
1	7.9; 5.8; 4.2; 3.3; 2.4; 1.9; 1.7

Эксперименты с отдельными клетками показали, что при добавлении в среду токсиканта в большинстве случаев клетки также давали глоу, однако значительно более низкой интенсивности и продолжительности. Если предположить такой характер реакции большинства клеток на токсикант, то необъяснимым останется факт строгой периодичности флуктуаций глоу как в пораженных токсикантом культурах, так и при многосуточной их экспозиции в чистой воде. Подобная синхронность сотен клеток в генерации низкоуровневого излучения может свидетельствовать о внутриволюционной коммуникации. К подобным выводам пришли Р. Краснов с соавт., работая с культурой *Gonyaulax* (Krasnov et al., 1982).

В литературе отмечалось, что оптический канал связи при межклеточных взаимодействиях может осуществляться в ультрафиолетовой области спектра (Казначеев, Михайлова, 1981). Свечение динофитовых водорослей лежит в широкой области спектра от 380 до 500 нм с максимумом на 470 нм. Близость длин волн УФ-диапазона и сине-фиолетовой области биолюминесценции перидиней, в частности ночесветок, позволяет предполагать возможность осуществления коммуникации между клетками на данных длинах волн. Однако механизм возникновения и существования колебаний интенсивности глоу с периодом единицы минут-десятки минут остается неизвестным.

### Заключение

Частота спонтанных вспышек в популяциях *Noctiluca scintillans* Sur. зависит от концентрации клеток водорослей, при этом амплитуда световых сигналов не зависит от количества клеток. Причиной генерации микровспышек является, по-видимому, не тактильное взаимодействие.

Спонтанное низкоуровневое свечение в популяциях *N. scintillans* (глоу) возникает при экспозиции пробы в течение 5 ч и более, либо при взаимодействии с токсикантом. Причиной глоу может быть деградация клеток.

Установлен осциллирующий характер спонтанного свечения *N. scintillans*, выявлено основное время пульсаций, механизм которых остается неизвестным.

P.V. Yevstigneyev<sup>1</sup> & V.P. Yevstigneyev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> A.O. Kovalevsky Institute of Biology of Southern Seas, National Academy of Sciences of Ukraine, 2, Nakhimov Pr., 99011 Sevastopol, Crimea, Ukraine

<sup>2</sup> Sevastopol National Technical University, Chair of Physics, Studgorod, , 99053 Sevastopol, Crimea, Ukraine

### SPONTANEOUS BIOLUMINESCENCE OF *NOCTILUCA SCINTILLANS* SUR. (DINOPHYTA)

The paper is concerned with the spontaneous light emission of *Noctiluca scintillans* Sur. (*Dinophyta*) cells in the pure sea water and with the addition of a toxicant. It has been established that frequency of microflashes is a function of cell density and is not associated only with mechanical contacts. The addition of various doses of a toxicant results in low-level oscillating luminescence, the *Oscillation* period of which depends on the toxicant concentration and time of exposition.

**Key words:** spontaneous bioluminescence, *Noctiluca scintillans*, *Dinophyta*, toxicant, oscillations.

Бытоков Э.П. Распределение и экология *Noctiluca miliaris* в Черном море // Биол. моря. – 1969. – 3, № 17 – С. 76-95.

Бозин С.А., Филимонов В.С. Спонтанная биоломинесценция динофлагеллят в заливе Восток Японского моря // Океанология. – 1985. – 25, вып. 3. – С. 509-512.

Гителъзон И.И., Чумакова Р.И., Дегтярев В.И. и др. Биоломинесценция моря. – М.: Наука, 1969. – 183 с.

Дворянинов Г.С., Журавлева В.М., Прусов А.В. Анализ гидрометеорологических полей Тропической Атлантики на основе обобщенного метода максимальной энтропии // III Съезд сов. океанологов. Секц. физики и химии океана. Климат с взаимодействием океана и атмосферы. Космическая океанология. – Л., 1987. – С. 106-107.

Евстигнеев П.В. Влияние ряда токсических соединений на биоломинесценцию морских копепод // Эксперим. вод. токсикол. – 1990. – № 14. – С. 105-119.



- Biggley W.H., Swift E., Buchman R.J., Seliger H.H. Stimulable and spontaneous luminescence in marine dinoflagellate *Pyrodinium bahamense*, *Goniaulax polyedra* and *Pyrocystis lunula* // J. Gen. Physiol. – 1969. – 54, N 1. – P. 96-122.
- Hastings J.W., Sweeney B.M. A persistent diurnal rhythm of luminescence in *Goniaulax polyedra* // J. Cell Comp. Physiol. – 1958. – 115, N 3. – P. 440-458.
- Krasnow R., Vetterling W., Haas E., Dunlap J., Taylor W., Hastings J.W. Computer analysis of light emission and circadian rhythm of luminescence in populations and in single cells of the dinoflagellate *G. polyedra* // Bioluminescence in the Pacific. – Krasnoyarsk, 1982. – P. 150-164.
- Noarl Scientist Eurus Patent for Toxicity // Measurement Process-Sea Technol. – 1990. – 31, N 10. – P. 63
- Nordly E. Experimental studies on the ecology of Ceratia // Oikos. – 1957. – 8. – P. 200-265.
- Tett P.B. The relation between dinoflagellates and the bioluminescence of sea water // J. Mar. Biol. Assoc. U.K. – 1979. – 51, N 1. – P. 183-206.

Поступила 07.06.04

Подписала в печать Е.И. Шникова