

НОВЫЙ ЛАБОРАТОРНЫЙ КОМПЛЕКС ПО ИЗУЧЕНИЮ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ «СВЕТ М» *

Мельник Л. А., Жук В. Ф., Мельник А. В.

ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,

г. Севастополь, Российская Федерация,

e-mail: melnikla@ibss-ras.ru, zhukvf@ibss-ras.ru, melnikav@ibss-ras.ru

Аннотация: Лабораторные эксперименты по изучению возбуждённой биолюминесценции морских организмов за последние годы претерпели качественные изменения, в первую очередь связанные с прогрессом в области совершенствования светорегистрирующих датчиков и вычислительной техники, а также с необходимостью выявления спектральных характеристик отдельных биолюминесцентных организмов. Это позволило в значительной мере расширить и поднять на более высокую ступень анализ комплекса проблем, связанных со свечением моря. В лаборатории биолюминесценции отдела планктона ФИЦ ИнБЮМ был разработан прибор для изучения биолюминесценции в лабораторных условиях — «Свет М», апробация которого в полевых условиях прошла во время 136-го рейса НИС «Профессор Водяницкий». На борту судна были проведены исследования биолюминесценции гребневиков *Beroe ovata* (Mayer, 1912) и *Mnemiopsis leidyi* (A. Agassiz). В ходе экспериментов были успешно опробованы методы механической, электрической и химической стимуляции.

Ключевые слова: биолюминесценция, методы стимуляции, гребневики, лабораторные исследования, светоизлучение

Введение

Исследования биолюминесценции гидробионтов в лабораторных условиях в большинстве случаев направлены на определение индивидуальных особенностей светоизлучения того или иного организма, изучение оптического спектра квантовой эмиссии, а также выяснение специфичности механизмов генерации света [Токарев, Евстигнеев, Машукова, 2016]. Лабораторные опыты позволяют изучить парциальный вклад различных таксонов в пространственно-временную изменчивость биофизических полей пелагиали. Для получения биолюминесцентного отклика планктонных организмов в лабораторных условиях чаще всего используют химическую, электрическую или механическую стимуляцию светоизлучающей системы. В отделе планктона лаборатории биолюминесценции ФИЦ ИнБЮМ был разработан и собран новый прибор для регистрации биолюминесцентного потенциала — «Свет М» (рис. 1). В настоящее время прибор «Свет М» используется для изучения биолюминесценции методом химической, электрической и механической стимуляции гидробионтов. Ранее в ИнБЮМ были разработаны и созданы специально изготовленные комплексы аппаратуры — «Ночесветка», «Биолюм», «Свет», на которых проводили изучение характеристик светоизлучения планктонтов. Отличительной особенностью прибора «Свет М» от предыдущей модели («Свет») является увеличение объёма темновой камеры, что значительно расширяет спектр исследуемых биолюминесцентных организмов. В предыдущей версии прибора использовались кюветы объёмом 50 мл, новая конфигурация даёт возможность проводить опыты по высвечиванию морских организмов в лабораторных ёмкостях от 50 до 500 мл, что значительно расширяет качественный и количественный состав биолюминесцентных видов.

* Данная работа выполнена в рамках выполнения гос. задания ФИЦ ИнБЮМ №124030400057 «Трансформация структуры и функций экосистем морской пелагиали в условиях антропогенного воздействия и изменения климата».

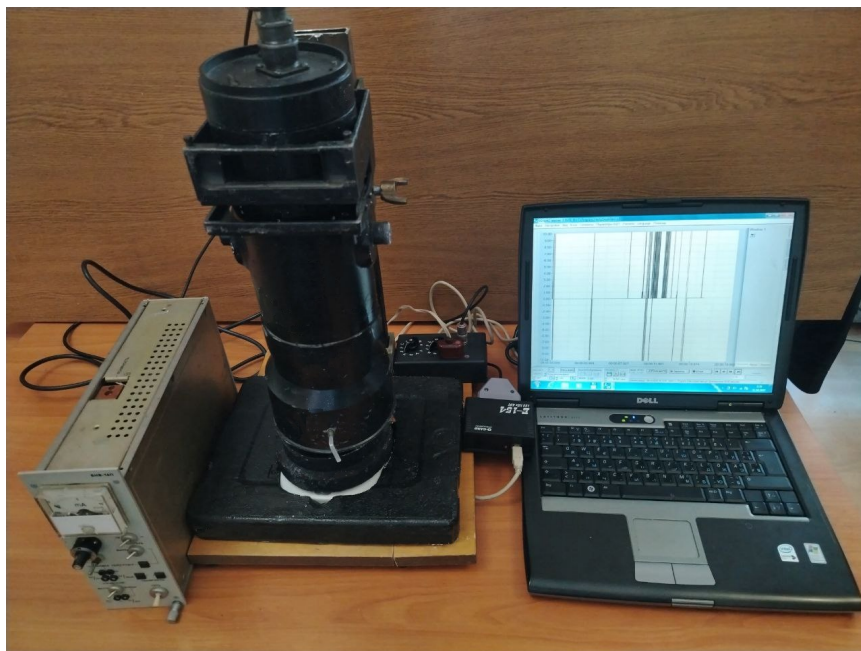


Рис. 1. Прибор «Свет М»

Материалы и методы исследований

Конструкция лабораторного измерительного комплекса включает в себя высоковольтный блок питания, люминескоп, состоящий из приёмника светового излучения (ФЭУ) и темновой камеры для объекта, аналого-цифровой преобразователь L-154, а также цифровой интерфейс (рис. 2). Частота регистрации биолюминесцентного сигнала составляет 10 кГц. Данные выводятся на экран в виде графика и записываются в текстовый файл с привязкой по времени. В темновую камеру люминескопа устанавливаются ёмкости из прозрачного стекла, в которые помещаются подопытные организмы.

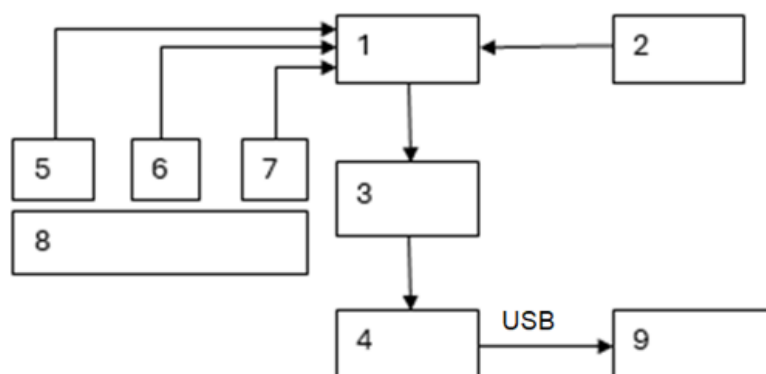


Рис. 2. Блок схема «Свет М»: 1 — приёмник светового излучения (ФЭУ); 2 — высоковольтный блок питания ФЭУ; 3 — согласующее устройство; 4 — аналого-цифровой преобразователь L-154; 5, 6, 7 — ёмкости с организмами для химической, электрической и механической стимуляции, расположенные в темновой камере; 8 — подставка под ёмкости; 9 — цифровой интерфейс

На рисунке 2 представлены разные виды ёмкостей, используемых при проведении опытов по высвечиванию организмов на лабораторном комплексе «Свет М».

Механический метод возбуждения биолюминесценции наиболее соответствует природным стимулам. В данной конструкции рабочий принцип механической стимуляции реализован на основе магнитной мешалки (рис. 3В) и заключается в том, что

- магнит электродвигателя при вращении создаёт поле;
- якорь (ведомый элемент), предварительно погружённый в жидкость, вступает с ним в электромагнитное взаимодействие и начинает вращаться;
- внутри посуды с жидкостью и помещённым в неё организмом образуется вихревой поток, стимулирующий светоизлучение планктонных биолюминесцентных организмов.

Возникающие при перемещении воды изменения гидрофизических характеристик приводят к деформации клеточной мембраны исследуемого организма, которая, в свою очередь, индуцирует возникновение потенциала действия и, как следствие, светоизлучения. Как отмечают многие авторы, механический метод возбуждения биолюминесценции используется при изучении суточной периодичности биолюминесцентных реакций и влияния света на них [Машукова, Токарев, 2015].

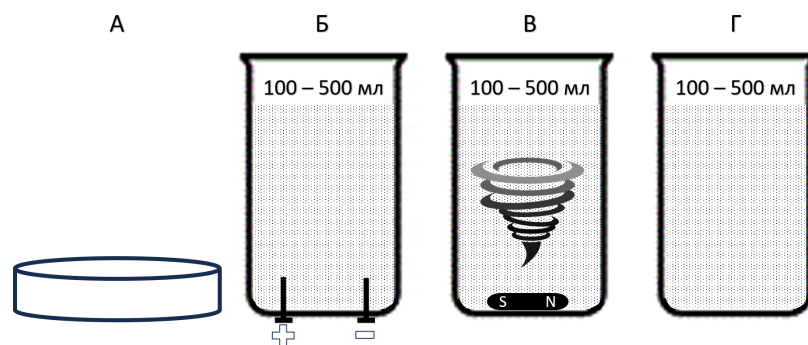


Рис. 3. А — чашка Петри, Б — ёмкость для электрической стимуляции, В — ёмкость для механической стимуляции, Г — ёмкость для химической стимуляции

Несмотря на очевидную неприродную составляющую, электрический метод стимуляции с успехом применяется в исследованиях светоизлучения планктонтов. С помощью электрической стимуляции возможно не только изучение латентного периода вспышек, но и оценка динамики биолюминесценции, исследование периода восстановления субстрата в случае неповреждающих величин тока [Токарев, Евстигнеев, Машукова, 2016].

Раздражающий импульс от электронного стимулятора через катодный повторитель подводился к электродам лабораторного стакана. Конструкция стакана (рис. 3Б) позволяет получить электрическое поле, близкое к плоскопараллельному, что исключает неравномерность плотности тока раздражения на различных участках рабочего объёма стакана.

Химический способ стимуляции биолюминесценции является самым надёжным из всех известных ныне способов раздражения люминесцентной системы организмов. Именно в силу этого химическая стимуляция широко применяется для получения информации об излучающей способности различных организмов.

При химической стимуляции светоизлучение организмов достигается добавлением в ёмкость (рис. 3А, 3Г) с подопытным организмом небольшого количества того или иного химического реагента, концентрация которого не должна превышать 10 %. К числу наиболее часто применяемых реагентов относятся: формалин, спирт, кислоты, ацетон, перекись водорода, йод, аммиак [Машукова, Токарев, Бурмистрова, 2008; Токарев, Василенко, Жук, 2009]. Известны случаи использования для химической стимуляции биолюминесцентных организмов пресной воды [Nicol, 1960], раствора хлористого калия [Herring, 1974], адреналина, ацетилхолина [Baquet, Ziets-Nicolas, 1979] и др.

Следует отметить, что при химической стимуляции организм чаще всего гибнет, что является очевидным недостатком метода. К недостаткам следует отнести и возникновение механического возбуждения при впрыскивании того или иного химического вещества, что делает невозможным разделение механического и химического стимулов при низкой концентрации реагента. Кроме того, при химической стимуляции очень сложно зафиксировать время начала раздражения. В то же время к преимуществам метода можно отнести высокую степень надёжности: химические стимулы приводят к эффекту светоизлучения даже тогда, когда другие методы не дают необходимого результата [Токарев, Евстигнеев, Машукова, 2016].

Эксперименты на новом лабораторном комплексе «Свет М» проводились во время 136-го рейса НИС «Профессор Водяницкий». Эксперимент проводился на гребневиках *Beroe ovata* и *Mnemiopsis leidyi*, которые отбирались с борта судна при помощи сачка с поверхности водной толщи. Для отлова организмов не использовали планктонные сети, так как гребневики, отобраные сетями, часто имеют значительные механические повреждения, что негативно отражается на качестве проводимых экспериментов. После этого организмы поднимались на поверхность, помещались в сосуд объёмом 3–5 л с профильтрованной (диаметр пор мембранных фильтров 35 мкм) морской водой. Далее организмы перемещались в отдельные ёмкости и переносились в лабораторию для экспериментов. Определение характеристик биолюминесценции гребневика проводили в дневное время при полной темноте. Конструктивные особенности темновой камеры установки «Свет М» и используемых в ней ёмкостей позволяли применять механический, электрический и химический способ стимуляции биолюминесцентной системы планктонов. Для каждого способа раздражения было отобрано по 5 гребневиков *Beroe ovata* и *Mnemiopsis leidyi* размером от 45 до 50 мм.

Результаты и обсуждение

Измерения характеристик биолюминесценции проводили у пяти особей каждой экспериментальной группы. Гребневиков до начала стимуляции их светоизлучения содержали при естественном освещении в профильтрованной морской воде с температурой (24 ± 2) °С. Организмы каждой группы гребневиков подвергали механической, электрической и химической стимуляции при помощи приборно-лабораторного комплекса «Свет М». Анализ биолюминесцентного сигнала состоял из трёх фаз.

Первая фаза исследования выполнена на основе механической стимуляции свечения за счёт создания вихревого потока воды в сосуде с гребневиком. Это вызывало деформацию клеточных мембран гребневика, возникновение потенциала действия и, как следствие, светоизлучение. Такой тип эксперимента близок к тому, что наиболее часто происходит в природных условиях: биолюминесцентные вспышки вызывает механический стимул в виде сдвигового движения жидкости [Токарев и др., 2006].

Вторая фаза экспериментов, основанная на электрической стимуляции, была выполнена на приборе такой конфигурации впервые. Раздражающий импульс напряжением 12 в от электронного стимулятора подавался на электроды лабораторного стакана. При таком напряжении исследуемый организм не погибает. Происходит внешнее раздражение ктенофор и, как следствие, светоизлучение организма.

Третья фаза экспериментов с использованием химической стимуляции проводилась для получения данных о максимальном биолюминесцентном потенциале. Для этого в ёмкость с гребневиками вводили не более 10 % от объёма жидкости 96%-ного этилового спирта. При этом амплитуда светоизлучения организма была максимальной.

Во время исследований черноморские гребневики *Beroe ovata* и *Mnemiopsis leidyi* высвечивались при всех методах стимуляции, однако характер сигналов значительно отличался (рис. 4).

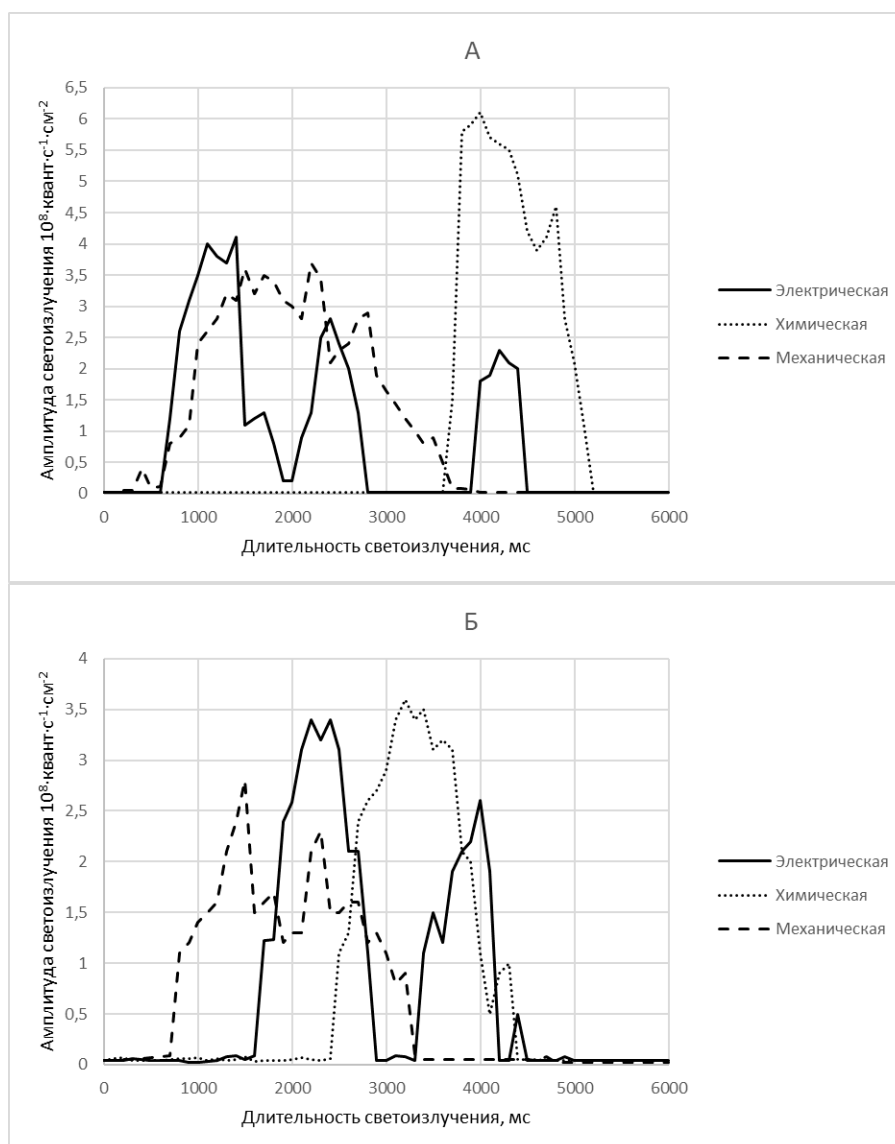


Рис. 4. Амплитуда биоломинесцентных пиков при разных методах стимуляции: А — *Beroe ovata*, Б — *Mnemiopsis leidyi*

Механическая стимуляция в большинстве случаев не приводит к гибели организмов, а лишь раздражает механорецепторные клетки гребневиков, что соответствует природным гидродинамическим стимулам (волнение воды, перемешивание водных масс и т. д.) по способу и интенсивности воздействия. При механической стимуляции наблюдается постепенное нарастание биоломинесцентного сигнала с последующим затуханием. Электрическая стимуляция при напряжении в 12 В также не приводит к гибели организмов, при этом биоломинесцентный сигнал характеризуется несколькими максимальными пиками светоизлучения. Химическая стимуляция приводит к полному высвечиванию особей, заканчивающемуся их гибелью. Так, амплитуда свечения гребневика при химической стимуляции характеризуется одним пиком светоизлучения и больше таковой при механической и электрической стимуляции. Данные различия в биоломинесценции гребневиков можно объяснить разной чувствительностью организмов к тому или иному стимулу.

Выводы

Исследование биолюминесценции широко проводится в ФИЦ ИнБЮМ и включает, помимо полевых исследований, также и лабораторные эксперименты. Последние ставят целью глубокое изучение физиологических и биофизических аспектов светоизлучения планктонных организмов. Описываемый лабораторный комплекс «Свет М» прошёл испытания в полевых и береговых условиях и показал широкие эксплуатационные возможности. Использование данного комплекса в дальнейшем позволит намного расширить количество исследуемых биолюминесцентных организмов, проводить модуляции всевозможных воздействующих внешних факторов, как абиотических, так и антропогенных. При использовании данного оборудования можно проводить эксперименты по изучению спонтанной биолюминесценции, которая может возникать у организмов без внешних раздражающих факторов.

Список литературы

1. Машукова О. В., Токарев Ю. Н. Биолюминесценция черноморского гребневика-вселенца *Mnemiopsis leidyi* A.Agassiz, 1865 как тест его физиологического состояния // Вестник Прикаспия. – 2015. – № 3. – С. 38–44. – <https://elibrary.ru/uicvbr>
2. Машукова О. В., Токарев Ю. Н., Бурмистрова Н. В. Характеристики светоизлучения черноморских гребневиков-вселенцев *Mnemiopsis leidyi* (A.Agassiz) и *Beroe ovata* (Mayer, 1912) // Актуальные вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии : «БФФХ – 2008» : IV Междунар. науч.-техн. конф., г. Севастополь, 21–26 апр. 2008 г. / Севастоп. нац. техн. ун-т [и др.]. – Севастополь : СевНТУ, 2008. – С. 157–160.
3. Токарев Ю. Н., Василенко В. И., Жук В. Ф. Новый гидробиофизический комплекс для экспрессной оценки состояния прибрежных экосистем // XI Международная научно-техническая конференция «Современные методы и средства океанологических исследований» : [МСОИ – 2009, Москва, 25–27 нояб. 2009 г.] / Рос. акад. наук [и др.]. – Москва : Изд-во РАН, 2009. – Ч. 3. – С. 23–27.
4. Токарев Ю. Н., Евстигнеев П. В., Машукова О. В. Планктонные биолюминесцентные Мирового океана: видовое разнообразие, характеристики светоизлучения в норме и при антропогенном воздействии. – Симферополь : Н. Орианда, 2016. – 340 с. – <https://elibrary.ru/trkhve>
5. Токарев Ю. Н., Мельников В. В., Евстигнеев П. В., Василенко В. И., Слипцевский Д. Я. Биолюминесценция океана: история исследований, развитие методической базы, нерешенные проблемы // Экология моря / НАН Украины, Ин-т биологии юж. морей им. А. О. Ковалевского. – Севастополь : ЭКОСИ – Гидрофизика, 2006. – Вып. 72. – С. 92–102. – <https://elibrary.ru/vlccux>
6. Baquet F., Ziets-Nicolas A. M. Fluorescence and luminescence of isolated photophores of *Porichthys* // Journal of Experimental Biology. – 1979. – Vol. 78, iss. 1. – P. 47–57. – <https://doi.org/10.1242/jeb.78.1.47>
7. Herring P. J. New observation on the bioluminescence of echinoderms // Journal of Zoology. – 1974. – Vol. 172, iss. 3. – P. 401–418. – <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1974.tb04116.x>
8. Nicol J. A. C. The regulation of light emission in animals // Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society. – 1960. – Vol. 35, iss. 1. – P. 1–40. – <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1960.tb01321.x>

NEW LABORATORY COMPLEX FOR THE STUDY OF BIOLUMINESCENCE «SVET M»

Melnik L. A., Zhuk V. F., Melnik A. V.

A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation,

e-mail: melnikla@ibss-ras.ru, zhukvf@ibss-ras.ru, melnikav@ibss-ras.ru

Abstract: Laboratory experiments on the study of excited bioluminescence of marine organisms have undergone qualitative changes in recent years, primarily related to progress in improving light-recording sensors and computer technology, as well as the need to identify the spectral characteristics of individual bioluminescent organisms. This made it possible to significantly expand and raise to a higher level the analysis of the complex of problems associated with the glow of the sea. In the laboratory of bioluminescence of the Department of Plankton of IBSS, a device for studying bioluminescence in laboratory conditions «Svet M» was developed, which was tested in the field on flight 136 of the RV «Professor Vodianitsky». Bioluminescence studies of ctenophores *Beroe ovata* (Mayer, 1912) and *Mnemiopsis leidyi* (A. Agassiz) were carried out on board the vessel. During the experiments, methods of mechanical, electrical and chemical stimulation were successfully tested.

Keywords: bioluminescence, stimulation methods, crests, laboratory studies, light emission

Сведения об авторах

Мельник
Лидия
Александровна младший научный сотрудник, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, e-mail: melnikla@ibss-ras.ru

Жук
Владимир
Федорович научный сотрудник, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, e-mail: zhukvf@ibss-ras.ru

Мельник
Александр
Валерьевич кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, e-mail: melnikav@ibss-ras.ru

Поступила в редакцию 11.01.2026

Принята к публикации 27.02.2026