



УДК 591.148:574.52:593.8(262.5)

О. В. Машукова, канд. биол. наук, с. н. с., **Ю. Н. Токарев**, докт. биол. наук, проф.

ФГБУН «Институт морских биологических исследований имени А. О. Ковалевского РАН», Севастополь, РФ

**ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ
MNEMIOPSIS LEIDYI A. AGASSIZ (STENOPHORA: LOBATA)
ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ**

Ранее нами показана видоспецифичность особенностей светоизлучения *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865 и *Beroe ovata* Mayer, 1912, изменение параметров их биолюминесценции (амплитуды, энергии, а также длительности светоизлучения) в зависимости от температурных, трофических и других условий. Целью настоящих исследований было выявление варибельности свечения черноморского гребневика *M. leidyi* в процессе его регенерации после воздействия хищника – *B. ovata*. Определение характеристик биолюминесценции гребневиков проводили при помощи лабораторного комплекса “Свет”. Биолюминесценцию ктенофор исследовали методом механической и химической стимуляции. Установлено, что после повреждений гребневика с сохранённым статостомом активно двигаются, при этом показатели их свечения минимальны: по амплитуде – $17.08 \cdot 10^8$ квант·с⁻¹·см⁻² и длительности 1.37 с при химической стимуляции и $14.85 \cdot 10^8$ квант·с⁻¹·см⁻² 1.25 с при механическом воздействии, соответственно. После полной регенерации происходит восстановление массы тела ктенофор до исходных значений и увеличение амплитуды их биолюминесценции до максимального уровня: $332.33 \pm 16.61 \cdot 10^8$ при химической и $219.45 \pm 10.97 \cdot 10^8$ квант·с⁻¹·см⁻² при механической стимуляциях. Сделаны предположения о факторах, влияющих на интенсивность регенерации ктенофор *M. leidyi* и варибельность их свечения в продолжение этого процесса. Показана возможность использования биолюминесценции для уточнения экологических особенностей данного вида ктенофор.

Ключевые слова: гребневика, регенерация, характеристики светоизлучения, Чёрное море

Биолюминесценция – проявление жизнедеятельности организма в виде электромагнитного излучения в видимой области спектра – является важнейшим экологическим и оптическим фактором морской среды [5]. Одни из наиболее массовых планктонных биолюминесцентных Мирового океана – различные виды гребневиков [8, 18], параметры светоизлучения которых и причины их варибельности изучены недостаточно [7, 11]. Так, для гребневика *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865 (далее – мнемипсиса) важнейшим стрессовым фактором является поедание его гребневиком *Beroe ovata* Mayer, 1912 (далее – берое). Известно также, что многие кишечнополостные и ктенофоры способны к регенерации после механических повреждений [6, 9, 12, 14, 15, 16, 17], однако повреждения, возникающие при отношении хищник-жертва, их влияние на функцио-

нальное состояние мнемипсиса и его способность к регенерации и высвечиванию в условиях, близких к *in situ*, до сих пор не изучены.

В связи с этим представляло интерес определить функционального состояния жертвы после разрыва её хищником, а также оценить способности *M. leidyi* к регенерации и варибельность характеристик светоизлучения гребневика в этот период.

Материал и методы. Исследования проводили в отделе биофизической экологии ФГБУН «Институт морских биологических исследований имени А.О. Ковалевского РАН». Сбор черноморских гребневиков проводили в октябре – ноябре в прибрежной зоне Севастополя и в 2-мильной зоне от неё. Для опытов отбирали одноразмерную группу особей – 50 мм для *B. ovata* и 40 мм для *M. leidyi*.

Сырой вес ктенофор определяли путём вы-

тесненного объёма воды из сосуда и подсушиванием на фильтровальной бумаге с последующим взвешиванием на микроаналитических весах (серии AN 50) с точностью до 0.01 г.

Средний вес отобранных для экспериментов в каждой серии особей *M. leidyi* составлял 9.16 ± 0.45 , а *B. ovata* – 10.88 ± 0.54 г.

В лабораторных исследованиях были созданы условия для содержания ктенофор, близкие к таковым *in situ*. Свежевыловленных ктенофор в течение 2 ч адаптировали к условиям эксперимента в ёмкостях объёмом 5 л с профильтрованной (диаметр пор мембранных фильтров 35 мкм) морской водой при температуре $21 \pm 2^\circ\text{C}$. Выбор температуры обусловлен тем, что данные температурные условия считают оптимальными для содержания гребневиков [1, 13]. При подготовке к кормлению ктенофор *B. ovata* отсаживали индивидуально в ёмкости с профильтрованной морской водой, а их пищу (*M. leidyi*) после предварительного взвешивания вносили по 1 экз. в каждый сосуд. Пищу давали в избытке, ежедневно контролируя её потребление [4].

Наблюдения за пищевым поведением *B. ovata* проводили визуально и с регистрацией на кинокамеру. Захват пищи наблюдался в среднем через 2 ч после её внесения. Заглатывая жертву, берос приобретает шарообразную форму и время переваривания пищи в экспериментах длится в среднем 4 – 5 ч. При этом выяснилось, что 80 % особей *B. ovata* захватывали жертву целиком, а остальные питались, разрывая её на части.

Наши дальнейшие исследования касались исключительно процессов регенерации группы особей *M. leidyi* после разрыва их *B. ovata*.

Мнемиопсиса разделяли на 3 группы. Первая, служившая контролем, состояла из неповреждённых свежевыловленных особей, вторая – из повреждённых особей длиной до 18 – 20 мм (с сохранённым аборальным органом и без него) после разрыва их хищником. Третью экспериментальную группу составляли гребневики после регенерации.

Степень повреждения мнемиопсиса оценивали путем микроскопического анализа повреждённых животных.

Первая группа мнемиопсиса высвечивалась после 2 ч адаптации в затемнённой лаборатории, вторая – непосредственно после повреждения организмов хищником. Третья группа находилась в отдельных ёмкостях с подкормкой. Кормовым объектом для *M. leidyi* была *Acartia tonsa* Dana

(Copepoda). Выбор объектов экспериментального кормления обусловлен тем, что во второй половине лета в Севастопольской бухте в составе мезозoopланктона в районе отлова гребневиков обычно преобладают каланоидные копеподы [3].

Об интенсивности выедания пищи гребневыми судили по опустошению их гастроваскулярной полости. Ежедневно проводили подсчёт рачков, при этом концентрацию кормовых организмов корректировали, поддерживая её на уровне не менее $0.35 \text{ мг} \cdot \text{сухой массы} \cdot \text{л}^{-1}$, для чего в экспериментальные сосуды вносили кормовые организмы в концентрации $70 \text{ экз} \cdot \text{л}^{-1}$ [3]. Подкормку проводили до достижения ктенофорами исходной массы (перед повреждением организмов гребневиком *B. ovata*).

Определение характеристик биолюминесценции гребневиков выполнено при помощи лабораторного комплекса «Свет» [5] при полной темноте в дневное время.

Биолюминесценцию ктенофор исследовали методом механической и химической стимуляции. Для получения адекватного природным стимулам раздражения использовали механическую стимуляцию, которая сводилась к созданию ускорения потока воды в сосуде с биолюминесцентом с помощью насосного электромеханического устройства. Для получения информации о максимальном биолюминесцентном потенциале гребневиков использовался метод химической стимуляции. При помощи шприца в кювету вводили 3 см^3 96% спирта, выбранного в качестве химического раздражителя [5].

Результаты. Изучение поведения гребневиков показало, что в первые часы экспозиции (после разрыва хищником) нарушается их двигательная активность, что выражалось в замедлении биения ресничек ктен. Разорванные «части» мнемиопсиса размером до 18 - 20 мм без аборального органа оседают на дно аквариума и в течение суток погибают.

Напротив, гребневики с сохранённым статоцистом активно двигаются даже после столь катастрофических повреждений. Биолюминесцентные сигналы таких «частей» *M. leidyi* имеют очень низкие показатели амплитуды по сравнению с контролем: до $17.08 \cdot 10^8 \text{ квант} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ при химическом способе раздражения и $14.85 \cdot 10^8 \text{ квант} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ при механической стимуляции (рис. 1).

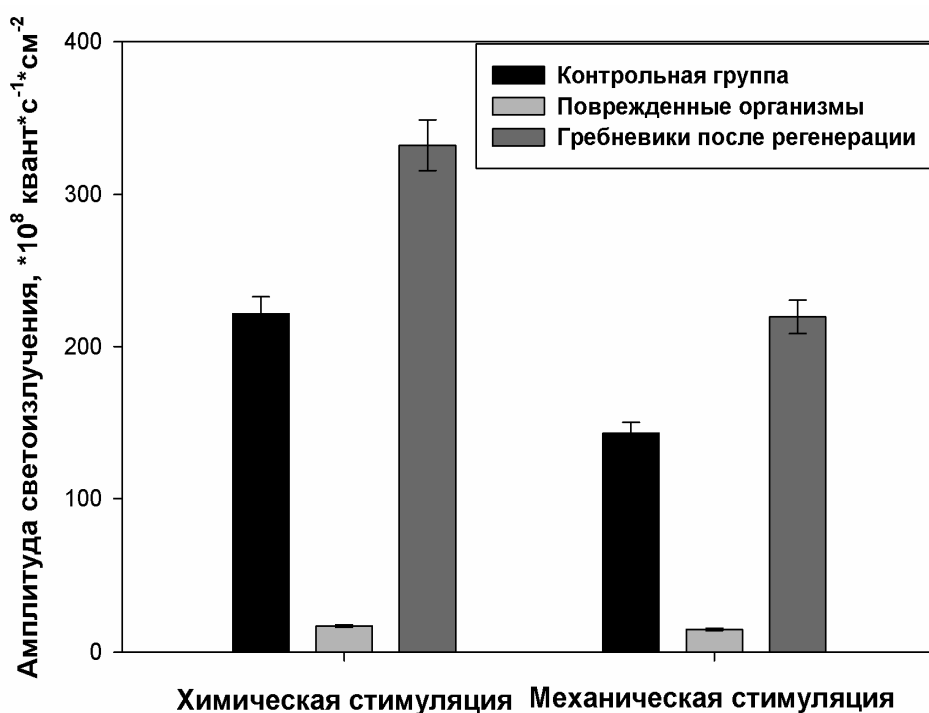


Рис. 1 Амплитуда биолюминесценции при регенерации *M. leidy* при механической и химической стимуляции
 Fig 1 Amplitude of the bioluminescence produced by regenerating *M. leidy* under the mechanical and chemical impacts

Длительность светоизлучения у повреждённых ктенофор также была невысока и составляла 1.37 и 1.25 с при химической и механической стимуляциях, соответственно (см. рис. 2).

Отличались и формы типичных сигналов ктенофор исследованных групп. Так, повреждённые гребневики в ответ на стимуляцию реагировали короткими по длительности вспышками: 1 – 2 пика небольшой интенсивности при незначительной энергии светоизлучения (рис. 3 А). Организмы после регенерации, напротив, демонстрировали серию ярких вспышек, перетекающих одна в другую, причём последующие вспышки по амплитуде были сравнимы с первоначальной (рис. 3 Б).

Проводимые ежедневно измерения орально-аборальной длины тела ктенофор третьей группы показали постепенное восстановление *M. leidy* до изначальной массы.

Полная регенерация мнемипсиса до изначального его размера и массы тела происходила на 3 – 4 сутки. Об этом свидетельствует и микроскопия повреждённых животных.

Так, спустя 3 – 4 дня после разрыва хищником новые гребные пластинки, форми-

рующиеся в раневом промежутке (щели), достаточно равномерно расположены и одинаковы по длине, что свидетельствует о законченном процессе регенерации [16].

При этом параметры свечения у пострегенерирующих особей существенно отличаются. Так, амплитуда биолюминесценции после регенерации у гребневиков была в 15 – 20 раз выше, чем у повреждённых организмов, составляя $332.33 \pm 16.61 \cdot 10^8$ при химической и $219.45 \pm 10.97 \cdot 10^8$ квант·с⁻¹·см⁻² при механической стимуляции. Неожиданным, однако, оказалось то обстоятельство, что интенсивность биолюминесценции регенерировавших гребневиков после полного их восстановления превышала таковую у контрольных организмов в 1.5 раза. Увеличивалась и продолжительность биолюминесцентных сигналов после регенерации ктенофор, составляя 3.67 и 3.25 с при химической и механической стимуляциях, соответственно (рис. 2).

Обсуждение. Регенерация – регуляторный процесс, характерный для многих организмов, благодаря которому происходит восстановление жизненно важных функций, утраченных при разных обстоятельствах. Стено-

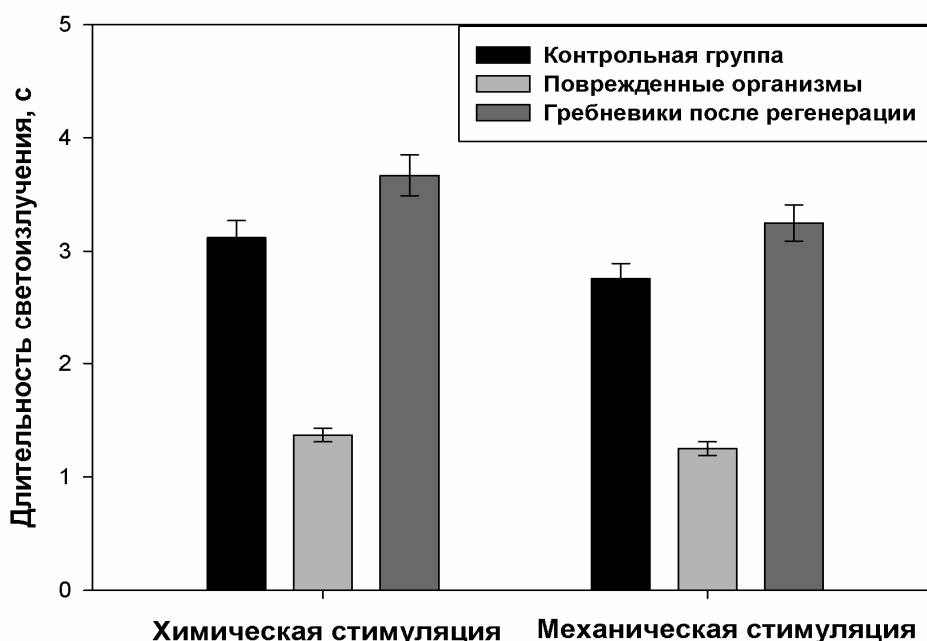


Рис. 2 Длительность биолюминесценции при регенерации *M. leidyi* при механической и химической стимуляциях

Fig. 2 Duration of the bioluminescence produced by regenerating *M. leidyi* under the impact of the mechanical and chemical stimulations

phores (Lobata, Tentaculates), в частности, показывают способность к восстановлению недостающих структур у взрослых особей [6], что и было доказано в наших экспериментах.

Регенерация недостающих частей тела у повреждённых организмов даёт информацию о механизмах, лежащих в основе данного процесса. С чем же связан высокий уровень регенерации у *M. leidyi*? Рядом авторов путём морфо-гистологического анализа показано, что успешная пострегенерация мнемииопсиса может быть обусловлена организацией строения его тела, имеющего билатеральную симметрию [6, 12]. Так, клетки, составляющие схему тела взрослого гребневика, обладают информацией о своем местонахождении, которая используется для его восстановления до исходных размеров [6]. Когда часть ряда гребных пластинок у *M. leidyi* удалена, рана закрывается и заживает, значительно увеличивая расстояние между ними около прежних краёв сокращения [16]. Вместе с тем, как и у остальных Stenophora, регенерация обусловлена высокой интенсивностью размножения этих самооплодотворяющихся гермафродитов. Так, *M. leidyi* начинает размножаться, достигнув орально-аборальной

длины тела 10 мм (13.5 мг сух. массы) при концентрации *Acartia clausi* 100 экз·л⁻¹ [10].

Однако существуют факторы, лимитирующие восстановительную способность особей. Так, не все повреждённые части гребневиков имеют способность к восстановлению, что обусловлено особенностями внутреннего строения ктенофор. Известно, что источником биолюминесценции у гребневиков являются специфические клетки – фотоциты [9], при раздражении которых происходит высвечивание внутриклеточных гранул, расположенных под гребными пластинками в области меридиональных гастроваскулярных каналов (рис. 4).

Те из них, которые сохранили аборальный орган, имеют больше возможности восстановить процессы жизнедеятельности и соответственно, биолюминесцентную реакцию. Более высокие показатели свечения гребневиков после их регенерации, на наш взгляд, обусловлены особенностями биохемилюминесцентной реакции ктенофор [7, 19], в частности, увеличением скорости образования пероксидных комплексов, последующий распад которых приводит к высвобождению большего количества энергии и максимальному светоизлучению.

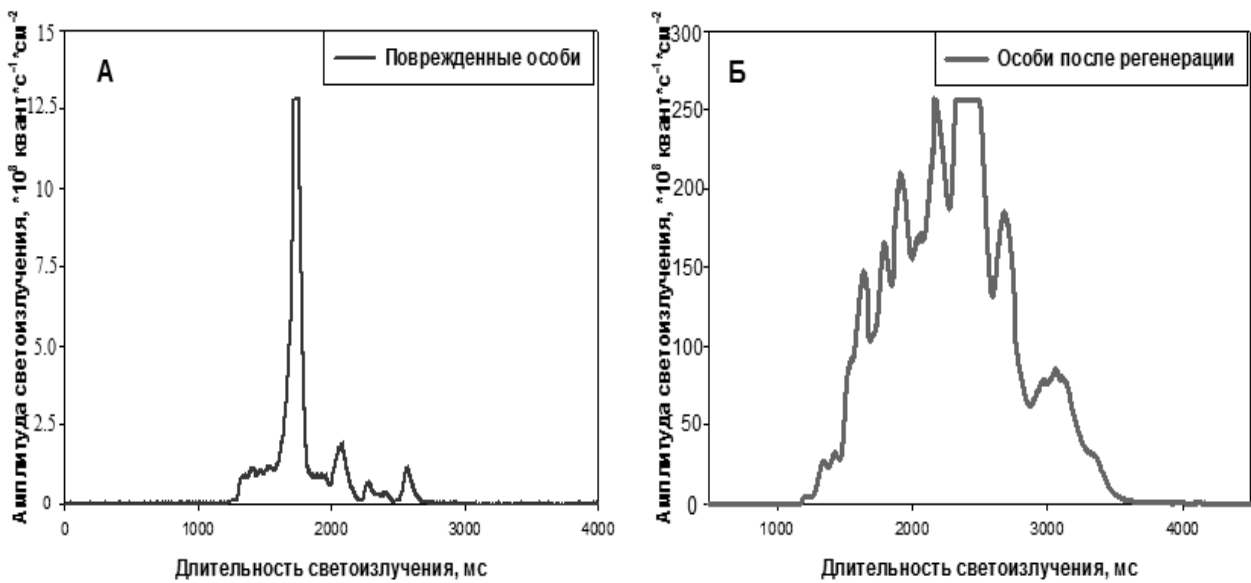


Рис. 3 Типичные билюминесцентные сигналы при химической стимуляции *M. leidy*: А – повреждённые особи; Б – пострегенерирующие особи

Fig. 3 Typical bioluminescence signals induced by the chemical stimulation of *M. leidy*: A – the injured individuals; B – the post-regeneration individuals

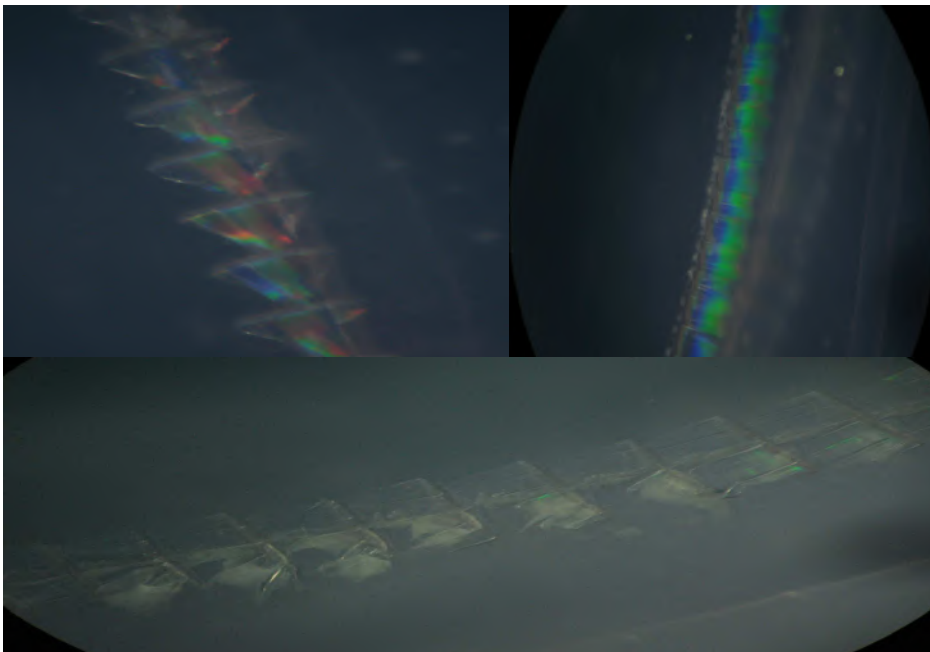


Рис. 4 Флуоресцирующие ктены *M. leidy*
Fig. 4 Fluorescent ctenophores of *M. leidy*

Последующие исследования характеристик светозлучения гребневиков, их пищевого поведения, закономерностей трофических взаимодействий внесут существенный вклад в познание роли взаимодействий хищник-жертва в функционировании морских планктонных сообществ, будут способствовать выявлению

экологического смысла билюминесценции исследуемых видов.

Выводы. 1. Нормальная жизнедеятельность гребневиков *Mnemiopsis leidy* без сохранения аборального органа с тяжами нервной и пищеварительной системы невозможна.

2. Низкие показатели свечения гребневиков при повреждении организмов связаны с нарушениями в их функциональном состоянии. Особи, сохранившие аборальный орган, имеют больше возможности восстановить процессы жизнедеятельности и, соответственно, биолюминесцентную реакцию. 3. Более высокие показатели свечения гребневиков после их регенерации могут быть обусловлены химизмом их биолюминесцентной реакции, т.е. увеличением скорости образования пероксидных комплексов, последующий распад которых приводит к высвобождению большого количества энергии и максимальному светоизлучению.

1. Аболмасова Г.И. Скорость энергетического обмена у *Mnemiopsis leidyi* (A. Agassiz) в зависимости от температурных и пищевых условий // Гидробиологический журнал. 2001. Т. 37, № 2. С. 90–95. [Abolmasova G.I. Energy exchange rate in *Mnemiopsis leidyi* (A. Agassiz) depending on the temperature and dietary conditions. *Hydrobiological Journal*, 2001, vol. 37, no. 2, pp. 90–95. (in Russ.)]
2. Битюков Э.П., Евстигнеев П.В., Токарев Ю.Н. Светящиеся Dinoflagellata Чёрного моря и влияние на них антропогенных факторов // Гидробиологический журнал. 1993. Т. 29, № 4. С. 27–34. [Bityukov E.P., Evstigneev P.V., Tokarev Yu.N. Luminescent Dinoflagellata of the Black Sea as affected by anthropogenic factors. *Hydrobiological Journal*, 1993, vol. 29, no. 4, pp. 27–34. (in Russ.)]
3. Машукова О.В., Ханайченко А.Н., Токарев Ю.Н., Бурмистрова Н.В. Влияние питания на биолюминесцентные характеристики гребневика *Mnemiopsis leidyi* (Ctenophora: Lobata) // Экология моря. 2008. Вып. 75. С. 42–47. [Mashukova O.V., Khanaichenko A.N., Tokarev Yu.N., Burmistrova N.V. Influence of nutrition on the bioluminescence characteristics of *Mnemiopsis leidyi* (Ctenophora: Lobata). *Ekologiya morya*, 2008, iss. 75, pp. 42–47. (in Russ.)]
4. Машукова О.В., Токарев Ю.Н. Вариабельность характеристик биолюминесценции черноморского гребневика *Beroe ovata* (Ctenophora: Beroidea) в связи с условиями питания // Экология моря. – 2009. – Вып. 77. – С. 23–27. [Mashukova O.V., Tokarev Yu.N. Variability of the bioluminescence characteristics of the Black Sea ctenophore *Beroe ovata* (Ctenophora: Beroidea) in connection with conditions of nutrition. *Ekologiya morya*, 2009, iss. 77, pp. 23–27. (in Russ.)]
5. Токарев Ю.Н., Машукова О.В., Василенко В.И. Биолюминесценция черноморских гребневиков-вселенцев *Mnemiopsis leidyi* и *Beroe ovata* при механической и химической стимуляции // Экология моря. 2008. Вып. 76. С. 61–66. [Tokarev Yu.N., Mashukova O.V., Vasilenko V.I. The bioluminescence of ctenophore-aliens *Mnemiopsis leidyi* and *Beroe ovata* in the Black Seas at the mechanical and chemical stimulation. *Ekologiya morya*, 2008, iss. 76, pp. 61–66. (in Russ.)]
6. Jonathan Q., Henry M.Q., Martindale C. Regulation and Regeneration in the Ctenophore *Mnemiopsis leidyi*. *Developmental Biology*, 2000, vol. 227, iss. 2, pp. 720–733.
7. Haddock S.H.D., Case J.F. Bioluminescence spectra of shallow and deep-sea gelatinous zooplankton: ctenophores, medusae and siphonophores. *Marine Biology*, 1999, vol. 133, pp. 571–582.
8. Haddock S.H.D., Moline M.A., Case J.F. Bioluminescence in the Sea. *Annual Review of Marine Science*, 2010, vol. 2, pp. 443–493.
9. Hernandez-Nicaise M.L. *Ctenophora Microscopic Anatomy of Invertebrates*. In: Harrison F.W., Westfall J.A. (Eds.) *Microscopic anatomy of invertebrates. Vol. 2: Placozoa, Porifera, Cnidaria, and Ctenophora*. New York: Wiley-Liss, 1991, pp. 359–418.
10. Finenko G.A., Romanova Z.A. The population dynamics and energetics of ctenophore *Mnemiopsis leidyi* in Sevastopol Bay. *Oceanology*, 2000, vol. 40, no. 5, pp. 677–685.
11. Labas Y.A., Gurskaya N.G., Yanushevich Y.G., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A., Matz M.V. Diversity and evolution of the green fluorescent protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, vol. 99, no. 7, pp. 4256–4261.
12. Martindale M.Q., Henry J.Q. Development and regeneration of comb plates in the ctenophore *Mnemiopsis leidyi*. *Biological Bulletin*, 1996, vol. 191, no. 2, pp. 290–292.
13. Mashukova O., Tokarev Yu. Influence of the temperature at the Black Sea ctenophores-aliens bioluminescence characteristics. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2012, vol. 3, no. 3, pp. 269–273. Available at: <http://www.scirp.org/journal/abb/> [accessed 2015.12.17].
14. Muller W.A., Plickert G., Berking S. Regeneration in Hydrozoa: distal versus proximal transformation in Hydractinia. *Roux's Archives of Developmental Biology*, 1986, vol. 195, iss. 8, pp. 513–518.

15. Piraino S.V., De Vito D., Schmich D.J., Bouillon J., Boero F. Reverse development in Cnidaria. *Canadian Journal of Zoology*, 2004, vol. 82, no. 11, pp. 1748–1754.
16. Tamm S.L. Regeneration of ciliary comb plates in the ctenophore *Mnemiopsis leidyi* I. Morphology. *Journal of Morphology*, 2012, vol. 273, iss. 1, pp. 109–120.
17. Tardent P. Regeneration in the HYDROZOA. *Biological Reviews*, 1963, vol. 38, iss. 3, pp. 293–333.
18. Tokarev Yu., Sibirtsova E., Mashukova O. Bioluminescence characteristics changeability of ctenophore *Beroe ovata* Mayer 1912 (Beroida) in ontogenesis. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2012. vol. 12, no. 5, pp. 479–484. Available at: http://www.trjfas.org/uploads/pdf_530.pdf [accessed 2015.12.17].
19. Ward W.W., Cormier M.J. Biochemistry extraction of *Renilla*-type luciferin from the calcium-activated photoproteins aequorin, mnemiopsin, and berovin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1975, vol. 72, no. 7, pp. 2530–2534.

Поступила 10 декабря 2015 г.

Variability of *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz (Ctenophora: Lobata) bioluminescence in relation to regeneration.

O. V. Mashukova, Yu. N. Tokarev. Our previous works have been shown the light-emission of *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865 and *Beroe ovata* Mayer, 1912 is species-specific and variability of bioluminescence parameters (amplitude, energy and also light-emission duration) depending on temperature, food supply and other factors. Revealing of *M. leidyi* light-emission variability during their regeneration after impact of predaceous organism *B. ovata* was the aim of our investigations. Definition of ctenophores bioluminescence characteristics was carry out on the laboratory complex “Light”. The ctenophore bioluminescence was investigated by method of mechanical and chemical stimulation. The ctenophores, which were seriously injured but preserved their statocyst intact, went on actively moving but the characteristics of their light-emission lessened to minimal – $17.08 \cdot 10^8$ quantum \cdot s $^{-1}$ \cdot cm $^{-2}$ and 1.37 s under chemical stimulation, and $14.85 \cdot 10^8$ quantum \cdot s $^{-1}$ \cdot cm $^{-2}$ and 1.25 s under the mechanical impact, respectively. Having completed regeneration and restored the body weight to the initial, the ctenophores maximally increased light emission – to $332.33 \pm 16.61 \cdot 10^8$ quantum \cdot s $^{-1}$ \cdot cm $^{-2}$ under the chemical stimulation and to $219.45 \pm 10.97 \cdot 10^8$ quantum \cdot s $^{-1}$ \cdot cm $^{-2}$ under the mechanical excitation. Assumptions of the factors having an impact on *M. leidyi* regeneration intensity and their luminescence variability of throughout this process are made. Consequently, the possibility of bioluminescence applying for species ecology specification is shown.

Keywords: ctenophores, regeneration, light-emission characteristics, Black Sea