

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение

высшего образования

«РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ГИДРОМЕТЕОРОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра прикладной океанографии ЮНЕСКО-МОК и охраны природных в

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

(магистерская диссертация)

На тему Возможность исследования количественных показателей планктонных сообществ in situ с применением оптических зондирующих устройств

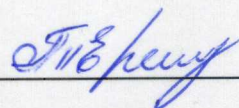
Исполнитель Малыгин Егор Юрьевич

Руководитель кандидат географических наук

Хаймина Ольга Владимировна

«К защите допускаю»

Заведующий кафедрой



кандидат физ.-мат. наук, доцент,

Ерёмина Татьяна Рэмовна

« 09 » 06 2018 г.

Санкт-Петербург

2018

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ГИДРОМЕТЕОРОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра прикладной океанографии ЮНЕСКО-МОК и охраны природных вод

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
(магистерская диссертация)

На тему Возможность исследования количественных показателей планктонных сообществ *in situ* с применением оптических зондирующих устройств

Исполнитель Малыгин Егор Юрьевич

Руководитель кандидат географических наук
Хаймина Ольга Владимировна

«К защите допускаю»

Заведующий кафедрой _____

кандидат физ.-мат. наук, доцент,

Ерёмина Татьяна Рэмовна

«__» _____ 20__ г.

Санкт–Петербург

2018

	Стр.
Введение	3
1 Билюминесценция гидробионтов и возможности ее стимуляции	6
1.1 Билюминесценция	6
1.2 Роль различных групп организмов в формировании билюминесцентного поля океана	8
1.3 Методы стимуляции	22
2 Методы и средства проведения исследования билюминесценции	25
2.1 Методы исследований свечения моря	25
2.1.1 Визуальные наблюдения	25
2.1.2 Инструментальные наблюдения	28
2.1.3 Лабораторные исследования	34
2.2 Обзор и анализ существующих батифотометров	35
2.3 Результаты лабораторных исследований ультразвукового метода стимуляции	46
3 Разработка макета батифотометра с ультразвуковой системой стимуляции	61
3.1 Выбор комплектующих для проектируемого батифотометра	61
3.2 Разработка виртуальной трехмерной модели прибора	70
3.3 Принцип работы спроектированного батифотометра	73
Заключение	75
Список использованных источников	77

ВВЕДЕНИЕ

Биолюминесценция – проявление жизнедеятельности организма в виде электромагнитного излучения в видимой области спектра, кинетические закономерности которого тесно связаны с кинетикой и механизмом порождающих его химических реакций и процессов метаболизма.

Биолюминесценция обнаружена у более 700 видов морских и наземных организмов всех уровней филогенеза, от бактерий до рыб. Около 80 % известных биолюминесцентных организмов обитают в Океане, среди них много глубоководных.

Вклад различных систематических групп гидробионтов в биолюминесценцию неодинаков – основная роль в создании биолюминесцентного излучения принадлежит планктонным организмам.

Для регистрирования *in situ* биолюминесценции планктонных организмов были разработаны погружаемые измерительные устройства, которые получили название батифотометры, причем наиболее перспективными и точными признаются методы буксировки и зондирования.

Актуальность исследования

Исследование динамики характеристик биолюминесценции водной толщи при помощи батифотометров, актуально для выявления общих закономерностей функционирования планктонных сообществ, а также причин, вызывающих их изменчивость во времени и пространстве. В свою очередь производительность батифотометров сильно зависит от эффективности стимуляции биолюминесценции, которая является необходимым аспектом для возбуждения свечения. При этом на эффективность стимуляции влияют такие параметры, как степень потери сигнала преждевременным возбуждением в приемнике батифотометра, а также продолжительность и интенсивность возбуждения.

Актуальность темы магистерской диссертации связана с недостаточной эффективностью методов стимулирования в существующих батифотометрах и заключается в необходимости разработки усовершенствованной системы стимуляции биолюминесценции, которая позволит улучшить качество измерений биолюминесценции планктонных сообществ *in situ* с применением оптических зондирующих устройств.

Объект исследования – биолюминесценция планктонных сообществ.

Предмет исследования – методы стимуляции биолюминесценции планктонных организмов.

Цель исследования – усовершенствовать метод стимулирования биолюминесценции планктонных организмов и предложить его техническую реализацию в существующих батифотометрах или новом зондирующем устройстве.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи исследования:

- 1) проанализировать особенности биолюминесценции планктонных организмов;
- 2) найти подтверждение возможности использования ультразвукового метода стимулирования биолюминесценции планктонных организмов;
- 3) сравнить эффективность существующих методов стимуляции биолюминесценции с ультразвуковым методом;
- 4) спроектировать батифотометр, использующий ультразвуковой метод стимуляции планктонных организмов;
- 5) построить виртуальную трёхмерную модель спроектированного батифотометра.

Научная новизна исследования.

Впервые был спроектирован батифотометр, использующий новую эффективную систему стимуляции биолюминесценции планктонных организмов при помощи ультразвуковых волн;

Практическая значимость работы. Полученные результаты исследования и макетирования могут быть использованы при создании

батифотометра, использующего высокоэффективный метод стимуляции биолюминесценции планктонных организмов, который позволит улучшить качество проводимых измерений биолюминесценции планктонных сообществ *in situ* с применением оптических зондирующих устройств.

Объем и структура диссертации

Магистерская диссертация состоит из введения, трех глав, заключения и списка использованных источников. Материал диссертации изложен на 81 странице, включает 34 рисунка и 12 таблиц. Список использованных источников содержит 37 наименований.

Содержание работы

Во *введении* обосновывается актуальность выбранной темы диссертационного исследования, обсуждаются цели и задачи исследования, научная новизна, научная и практическая значимость диссертации. Кратко представлено содержание диссертации.

В *главе 1* дается описание явления биолюминесценции, роль различных групп организмов в формировании биолюминесцентного поля. Были рассмотрены региональные сообщества биолюминесцирующих гидробионтов, существующие в Черном, Баренцевом и Норвежском морях, а также методы стимуляции биолюминесценции.

В *главе 2* дается описание существующих методов исследования биолюминесценции, проводится анализ существующих приборов, разработанных для измерения биолюминесценции, а также приводятся факты, подтверждающие эффективность использования ультразвукового метода стимуляции.

В *главе 3* выполняется выбор комплектующих для создания батифотометра на основе анализа существующих приборов, приводится схема расположения комплектующих, а также представлены результаты построения виртуальной трёхмерной модели батифотометра, использующего ультразвуковую систему стимуляции.

В *заключении* сформулированы основные результаты диссертационного исследования.

1 Билюминесценция гидробионтов и возможности ее стимуляции

1.1 Билюминесценция

Билюминесценция – реакция организма, выраженная электромагнитным излучением в видимой области спектра. Закономерности этого свечения непосредственно зависят от механизма создающих его хим. реакции и метаболизма. Билюминесценция относится только к живым организмам у которых есть особый ферментативный орган, чего нельзя сказать о сверхслабом спонтанном свечении, биотермохемилюминесценции, радиохемилюминесценции и фотосинтетической биохемилюминесценции. На сегодня билюминесценция морских организмов зафиксирована у представителей 28 отрядов животных и растений, стоит отметить, что крайне обширно это явление присуще бактериям, динофлагеллятам, простейшим, кишечнополостным, червям, моллюскам, ракообразным, рыб. [1].

Вклад разных гидробионтов в билюминесценцию различен – главная роль в формировании билюминесценции принадлежит планктонным организмам [2].

Существующие гипотезы об использовании гидробионтами различий между фоновыми оптическими характеристиками и параметрами билюминесценции сводятся, в основном, к нескольким вариантам [1]:

- приманивание жертвы;
- отпугивание хищников;
- маскировка и контриллюминация;
- половой признак;
- избегание хищников;
- межвидовое и межпопуляционное средство коммуникации;
- внутривидовой отличительный признак.

Свечение планктона, чаще всего является ответной реакцией на внешнее возмущение (механическое, электрическое, оптическое, химическое и т.д.) и проявляется сформированным импульсом с амплитудой от 10^{-5} до 10^{-1} мкВт/см² на расстоянии 1 см с фотокатода ФЭУ, с длительностью с 0.1 по 1.5 с [1].

Биолюминесцентное свечение планктонных организмов приходится на спектральный диапазон от 410 до 710 нм. Для большинства морских организмов длина волны их излучения находится в интервале между 450 и 490 нм, которая проявляется как синий свет, обладающий оптимальной светопередачей в морской воде [6].

Полный световой эффект, образуемый в толще воды совокупностью морских биолюминесцентных организмов называется полем биолюминесценции [6]. Ниже фотического слоя, где на нижнем горизонте освещённость достигает не меньше 1 % от поверхностной, только поле биолюминесценции по амплитудным и спектральным характеристикам имеет возможность быть средством обмена информацией среди гидробионтных организмов (внутривидового общения, охоты, симбиотических отношений и т.д.) [1].

В результате проведенных исследования было выявлено, что интенсивность поля биолюминесценции имеет возможность оцениваться как чувствительный показатель для диагностики функционального состояния пелагического сообщества с учетом физических процессов, существующих в морской среде, и загрязненности морских экосистем. Поле биолюминесценции существует повсюду в различное время суток при значительных региональных и сезонных отличиях. [6].

Измерение интенсивности поля биолюминесценции широко применяется для выяснения пространственно-временной неоднородности планктонного сообщества [1].

Поле биолюминесценции подобно полям температуры и солености возможно представить, пользуясь трёхмерным измерением: горизонтальное, вертикальное и временное. Как и у гидрофизических полей, временной

масштаб существования неоднородностей поля биолюминесценции, обусловленных в значительной степени биологическими причинами, находится в тесной связи с их пространственными масштабами. Поэтому, в соответствии с классификацией классической океанологии и планктонологии, пространственно-временную изменчивость характеристик поля биолюминесценции разделяют на [1]:

1. Крупномасштабные неоднородности, вертикальные размеры которых составляют десятки-сотни метров, а горизонтальные – тысячи километров. Масштабы временной изменчивости таких неоднородностей составляют от сезонных до вековых.
2. Синоптические неоднородности, вертикальные размеры которых находятся в пределах нескольких десятков метров, а горизонтальные – сотни километров. Временной масштаб существования таких неоднородностей простирается от нескольких суток до месяцев.
3. Мезомасштабные неоднородности, вертикальные размеры которых составляют метр – десятки метров, а горизонтальные – сотни метров-десятки километров. Временная изменчивость на таких масштабах составляет от часов до суток.
4. Мелкомасштабные неоднородности, вертикальные размеры которых составляют сантиметры-метры, а горизонтальные - метры-сотни метров. Масштаб временной изменчивости мелкомасштабных неоднородностей составляет минуты-часы.

1.2 Роль различных групп организмов в формировании биолюминесцентного поля океана

Биолюминесценция существует во множестве систематических групп организмов растительного и животного мира, но большая их часть распространена в водных экосистемах [3].

Обычно свечение у организмов происходит в специальных клетках – фотоцитах. Некоторые ракообразных выпускают из отдельных желез струи люциферина и люциферазы в окружающую среду, где в результате их смешивания образуются светящиеся области. Большое количество различных видов креветок, кальмаров и рыб обладают довольно сложными светоизлучающими органами со световыми затворами, отражателями, светофильтрами, линзами. Они могут образовывать биолюминесцентные сигналы батареями фотофоров, располагающихся вдоль тела, подстраивать интенсивность излучаемого света, его спектральный состав и угловое распределение таким образом, чтобы как можно сильнее маскироваться в широком диапазоне цветовых условий при суточных миграциях. Большинство организмов в море создают световые сигналы собственными люциферин-люциферазными системами. Но некоторые виды кальмаров и рыб взамен этого пользуются культурами светящихся симбиотических бактерий, а некоторые ракообразные и рыбы способны излучать свет только при наличии в составе их пищи светящихся организмов. Неодинаковы и характеристики свечения организмов (интенсивность, длительность, спектральный состав), и вклад в свечение моря [3]. Рассмотрим это более подробно.

Бактерии – *Bacteria*. Среди всего множества биолюминесцирующих морских организмов наиболее мелкими являются светящиеся. Согласно нынешней классификации биолюминесцирующих бактерий моря причисляют к родам *Photobacterium*, *Alteromonas*, *Beneckea* (*Vibrio*) [3].

Биолюминесцирующие бактерии считаются облигатными аэробами по сведению и факультативными анаэробами в отношении роста. В процессе аэробного роста они пользуются кислородом, который также является обязательным элементом в процессе формирования свечения [3].

Чаще всего биолюминесцентные бактерии являются теплолюбивыми, температура 26 – 39°C комфортна для их роста, но также бывают бактерии,

люминесцирующие и при низких температурах, около нуля. По всей видимости, как раз они и являются причиной свечения морского льда [3].

Биолюминесцентные бактерии – галофильны, наиболее подходящей для них является среда с морской концентрацией солей. При опреснении ниже 11 – 12 ‰ бактерии прекращают испускать свет, однако не утрачивают способности к росту [3].

Умение испускать свет у них появляется лишь при достижении конкретной концентрации, которая является отличительной чертой для каждого вида. У отдельных видов биолюминесцирующих бактерий синтез люциферазы происходит уже после накопления в среде аутоиндуктора – специфического вещества, выделяемого ими в ходе жизнедеятельности [3].

В море среди организмов способных светиться лишь бактерии испускают свет непрерывно [3].

В биолюминесценцию моря также приносят свой вклад ракообразные, которые были инфицированы люминесцирующими бактериями. Из числа морских беспозвоночных крайне восприимчивы животные родов *Talitrus* и *Orchestia* (*Amphipoda*, *Talitridae*). Помимо этого, типичны случаи бактериального свечения морских креветок, крабов и изопод [3].

В противопоставление свободноживущим и паразитическим бактериальным организмам, симбиотические бактерии обширно распространены. Чаще всего симбиотические бактерии попадают у рыб и головоногих. Известны симбиотические бактерии у оболочников *Pyrosoma*, *Salpaeu* *Ascidia*. При этом концентрация бактерий в световых органах организмов может превышать 10^{10} кл/мл [3]. Проявление бактериального симбиоза оказалось до такой степени обширно распространенным, что, как справедливо считает Э.Н. Харвей – «любой исследователь, обнаруживающий неизвестный прежде организм, излучающий свет, должен сначала узнать, светится это животное благодаря собственному свету или его свечение вызвано симбиотическими бактериями» [цитируется по 3].

В тропических широтах светящиеся бактерии в основном состоят из *Photobacterium leiognathi* и *Beneckea harveyi*, в умеренных широтах – *Photobacterium fischeri* и *Beneckea harveyi*; в бореальных и арктических широтах – *Photobacterium logei* и *Photobacterium phosphoreum*, тогда как в глубинных водах, как правило, встречается только *Photobacterium phosphoreum* [3].

Проеденные исследования последних лет обнаружили, что биолюминесцирующие бактерии играют значительную роль в морских биоценозах. В водах открытого океана от 1 до 10 % сапрофитных бактерий относится к видам, излучающим свет. В богатых органическим веществом водах лагун коралловых атоллов и некоторых шельфов их доля может достигать 60 %. Установлено, что биолюминесцирующие бактерии являются факультативными, при этом достаточно частыми обитателями кишечника многочисленных видов пелагических рыб, кальмаров и донных моллюсков, иглокожих, губок [3].

Для многих морских светящихся бактерий из родов *Vibrio* и *Photobacterium*, которые являются факультативными симбионтами, пребывание в свободной фазе в морской воде является транзиторным. Способность излучать свет, скорее всего, используется у них как приманка, обеспечивающая проникновение в кишечник хозяина. Описана сложная и биологически совершенная система внешней регуляции их свечения через индукцию синтеза люциферазы аутоиндуктором. Благодаря этим данным можно сделать вывод, что светящиеся бактерии владеют существенной системообразующей функцией в морских сообществах, все стороны которой еще далеко не выяснены [3].

Динофлагелляты – *Dinophyta*. Динофлагелляты наравне с радиоляриями, копеподами и остракодами в первую очередь несут ответственность за формирование биолюминесцентного поля крупных пространств океана [3].

Панцирные жгутиконосцы (класс *Dinophyceae*) представляют собой большую группу. Светящимися принято считать роды *Prorocentrum*, *Gymnodinium*, *Polykrikosi* *Noctiluca*, *Pyrocystis*, *Dissodinium*, *Peridinium*,

Glenodinium, *Gonyaulax*, *Pyrodinium*, *Ceratium*. Некоторые исследователи заявляют, что при конкретных условиях все динофлагелляты способны к свечению [3].

Излучение динофлагеллят происходит импульсами. Возбужденная клетка через несколько миллисекунд после воздействия раздражителя вспыхивает на 100 – 300 мс и вновь угасает. Отличительная сторона биолюминесценции ночесветки, как и многих других живых излучателей, состоит в том, что невозбужденный организм не светит. Излучающими органоидами ночесветки служат сцинтиллоны, при этом каждый сцинтиллон излучает независимо [3].

Жгутиконосцы распространены практически во всем Мировом океане и попадают во любое время года. При этом для динофлагеллят свойственна эвригалинность и эвритермность. Они проживают в разных средах от пресных эстуарных вод до соленых океанических акваторий и от полярных до экваториальных Широт. Сравнительно хорошо изучены только несколько видов, из которых на первое место следует поставить виды родов *Noctiluca* и *Gonyaulax* [3].

Noctiluca весьма обширно распространена и предпочитает холодные воды, подходящая для нее температура составляет 4 – 16 °С. Она выдерживает опреснение до 12 ‰, однако дальнейшее снижение солености может привести к прекращению свечения [3].

В открытом океане доминирующая форма больших перидиней – *Pyrocystis*, которая в отличие от ночесветки обладает хлорофиллом, способна к фотосинтезу и у которой проявляется отчетливо выраженный суточный ритм биолюминесценции. Виды рода *Pyrocystis*, в особенности *P. pseudonociluca*, вносят крупный, в некоторых случаях основной вклад в свечение верхней стометровой толщи вод в тропических и экваториальных широтах океана. Интенсивность ее световых вспышек в 100 – 1000 раз превосходит интенсивность вспышек других фотосинтезирующих динофлагеллят. Массовое формирование жгутиконосцев может служить причиной «красного прилива» [3].

В отдельных районах океана значительной численности достигают динофлагелляты родов *Gonyaulax*, *Ceratium*, *Pyrodinium*. Так, например, в заливе Бая Фосфоресценте, у берегов Ямайки, численность *Pyrodinium bahamense* достигала 200 тыс. кл/л [3].

Простейшие — *Protozoa*. К простейшим, которые светятся можно отнести радиолярии. Они крайне редко формируют крупные скопления, по этой причине их излучение не столь значительно, как излучение образующих слои перидиней [3].

Точно таким же образом, как и огромное количество биолюминесцирующих организмов радиолярии формируют световое излучение в результате стимулирующего воздействия. Излучение подобных организмов, не ингибируется светом и может происходить и в отсутствие кислорода [3].

Однако роль радиолярий в формировании поля биолюминесценции слишком мала. Радиолярии встречаются довольно обширно, но, в основном, в глубинных водах, давая максимальность разнообразия в слое между одной и двумя тысячами метров. Отдельные виды радиолярий верхних слоев океана иногда включают симбиотические динофлагелляты из биолюминесцирующего рода *Pyrocystis* что может привести к ошибкам в изучении излучения данных организмов [3].

Кишечнополостные — *Coelenterata*. Биолюминесценция у кишечнополостных является достаточно распространенной. Крайне грубо кишечнополостных возможно поделить на гидромедуз, сцифомедуз, и ктенофор.

Гидромедузы. Общеизвестны несколько десятков видов люминесцирующих медуз, чьи органы свечения представляют собою скопления специальных клеток. Гидромедузы имеют возможность проявлять свечение в сфере без кислорода, и в том числе и в вакууме [3].

Максимально распространенной является гидромедуза *Aequorea*. Ее излучение происходит внутри клеток. Вспышки *Aequorea* продолжаются 0,3 – 1,5 с, пиковая интенсивность достигается за 0,1 с (при 14 – 16°C).

Отличительная черта *Aequorea* заключается в том, что при общем стимулировании медуза испускает свет кольцом по краю тела, но при локальном стимулировании медуза люминесцирует ярким светом из области стимулирования [3].

Максимум спектра излучения изученных видов гидромедуз приходится на область 508 нм [3].

Наряду со сцифомедузами и ктенофорами, гидромедузы могут формировать скопления, которые можно зафиксировать эхолотом как слои, рассеивающие звук. В таких слоях обычно прослеживается увеличенный уровень биолюминесценции [3].

Сцифомедузы. Достоверно существует 4 люминесцирующих рода: *Periphylla*, *Atolla*, *Pelagia*, *Poralia*. *Pelagia noctiluca* массово распространена в Мировом океане. Ее колокол достигает 25 см в диаметре, а щупальцы длиной два метра. При стимулировании у *Pelagia noctiluca* происходит вспышка зеленым светом. Причем вспыхивают полосы на поверхности колокола и щупальца [3].

Люминесценция *P.noctiluca* внутриклеточная. Она отвечает на раздражение вспышками света, располагающиеся в области. Ее вспышка проявляется уже после 1-ого стимула, тогда как у иных кишечнополостных, вспышка проявляется лишь на 2-й или 3-й стимул [3].

Ктенофоры. Из числа нестрекающих кишечнополостных ктенофоры владеют самой мощной способностью к излучению. Люминесценция проявляется у родов *Pleurobrachia*, *Hormiphora*, *Callianira*, *Bolinopsis*, *Mnemiopsis*, *Leucothea* (-*Eucharis*), *Ocyropsis*, *Deiocpea*, *Eurhamphea*, *Cestum*, *Beroe* [3].

Животные люминесцируют внутриклеточно. Отличительная черта биолюминесцентных гребневиков заключается в том, что они угасают при внешнем освещении, для того, чтобы пресечь свечение достаточно лунного света. У *Bolinopsis* и *Pleorobrachia* отмечается способность к спонтанному свечению [3].

Mnemiopsis обладает восьмью рядами плавательных пластинок, на которых располагаются рецепторы, чувствительные к механической стимуляции. Стоит отметить, что локальное раздражение приводит к распространению свечения по всему телу вдоль этих восьми меридианов. *Mnemiopsis* спокойно переносит низкие температуры. Например при изменении температуры среды с 20 до 3°C и сохранить ее такой на несколько часов, оно все равно будет отвечать излучением на раздражение [3].

Донные кишечнополостные. Билюминесцирующие кишечнополостные присутствуют среди гидроидных полипов, горгониевых кораллов и морских перьев. В случае если оказать механического воздействие на заросли коралловых полипов, то произойдет яркое точечное свечение, однако неясно, какая доля свечения относится собственно к кораллам, а какая – другим многочисленным животным, живущим в этих заросли [3].

Моллюски – *Mollusca*. Билюминесценция у моллюсков наблюдается у *Gastropoda*, *Bivalvia*, *Cephalopoda*. Эти организмов обладают люминесценцией всех типов – внутриклеточная, внеклеточная и бактериальная (симбиотическая). Довольно интересной является группа люминесцирующих головоногих моллюсков, которые представляют собой общераспространенную, богатую видами и весьма разнообразную группу организмов [3].

Головоногие имеют возможность создавать достаточно интенсивные поля билюминесценции, из-за своего обилия видов и широкой распространенности. Но при этом у них довольно невысокие концентрации в отличие от *Dinophita*, *Protozoa* и *Crustacea*, и при оценки их концентрации возникают аппаратные и методические трудности, которые дают возможность предположить незначительность их вклада в формирование поля билюминесценции [3].

Иглокожие – *Echinodermata*. Эта группа организмов весьма слабо исследована в отношении билюминесцентной способности. Установлено лишь, что на внешнее воздействие могут сгенерировать световые сигналы офиуры: *Ophioscolex*, *Amphiura*, *Amphiopholis*, *Ophiopsila*, *Ophiothrix*,

Ornithocantha. Значимость группы как потенциального участника формирования поля биолюминесценции непонятно, а точнее она мала [3].

Кольчатые черви — *Annelides*. Эгих животных разделяют на планктонные и донные формы, из-за их образа жизни [3].

Пелагические животные относятся к родам *Tomopheris*, *Eusyllis*, *Pinosyllis*, *Odontosyllis*. Свечение организмов может быть, как внутриклеточным, так и связанным с выделением секрета в воду [3].

У донных червей политех происходит свечение во время половой стадии. У них кардинально меняется облик при созревании половых продуктов и начинают формироваться органы свечения [3].

Ракообразные — *Crustacea*. Биолюминесцентные ракообразные в море представлены подклассами *Ostracoda*, *Copepoda*, *Malacostraca*. Они, так же как и простейшие лидируют в создании поля биолюминесценции океана. Интересная особенность у вида *Cypridina serrata*, это ракообразное в безлунные ночи начинает обильно подниматься к поверхности, такое явление можно увидеть в Новой Гвинее [3].

Необходимо отметить, что рачки имеют свойство отвечать излучением на вспышку другой особи, точно такого же результата можно добиться и при помощи искусственного света. Рачки своим светом, поддерживают стимуляцию друг друга и продолжают светить. На механическое возбуждение они испускают вспышку в виде облака голубого света [3].

Остракоды светят лишь при выделении субстратов реакции в воду, но были зафиксированы точечные источники света внутри животных видов *Vargula* и *Conchoecia*. Продолжительность вспышек от субстратов, выброшенных в воду составляет несколько секунд, а точечные источники могут излучать свет несколько минут. Так же биолюминесцирующими оказались виды *Vargula* и *Cypridin* и животные рода *Pyrocypis* [3].

Среди *Copepoda* известно около 100 светящихся видов из отрядов *Cyclopoida*, *Harpacticoida* и *Calanoida* [3].

Картины свечения в Охотском море вызывают скопления *Metridia ochotensis*. По этим скоплениям светящихся рачков, которыми питается охотоморская сельдь, ориентируются рыбаки, так как ночью косяки сельди видны из-за свечения, которое они возбуждают, двигаясь в густых скоплениях рачков [3].

В подклассе *Malacostraca* светящиеся организмы есть в отрядах *Mysidacea*, *Amphipoda*, *Euphausiacea* и *Decapoda* [3]. Достоверно подтверждена светимость только одного глубоководного вида *Gnathophausia* [3].

Почти вся группа *Euphausiacea* формируется из светящихся представителей, кроме *Bentheuphausia*. Эуфаузииды светят благодаря внутриклеточная люминесценция, которая обусловлена довольно развитыми фотофорами, которые располагаются в глазных стебельках, абдомене и тораксе. Количество фототрофов у эуфаузиид может варьироваться от 3 до 10. Свечение этих живых существ может продолжаться более 30 мин, но каждая внешняя стимуляция получает в ответ вспышку. Свечение также стимулируется светом. Особенно эффективен голубой свет [3].

У крупных эуфаузиид (3-5 см) есть мощные световые железы, которые имеют характерное для каждого вида расположение. Железы достигают большой сложности, образуя специализированные излучающие органы, снабженные линзой и рефлектором. Свет эуфаузиид очень сильный. Рачок может управлять свечением, включая независимо разные группы желез. По данным Л. А. Пономаревой значительную долю пищи эуфаузиид составляют светящиеся рачки. Возможно, свет эуфаузиид используется для их привлечения. Не менее вероятно, что свет служит как ориентир при собирании эуфаузиид в стаи [3].

Способность эуфаузиид образовывать большие, иногда гигантские скопления (*Euphausia superba*) на поверхности океана и в его глубинах, позволяет допустить, что они могут играть существенную роль в формировании биолюминесцентного поля отдельных районов океана [3].

Среди *Decapoda* светятся в основном креветки, люминесценция которых может быть, как внеклеточной, так и внутриклеточной. Оценок биолюминесцентного потенциала этой группы планктона не делалось, хотя известно, что скопления светящихся креветок могут создавать значительный биолюминесцентный фон в отдельных слоях и районах океана. Органы свечения *Decapoda* (а соответственно и характеристики генерируемых ими биолюминесцентных сигналов) весьма разнообразны – от простого скопления фотогенных органов до фотофоров сложного строения, подобного органам свечения моллюсков и зуфаузиид [3].

Рассмотрев более 17 тысяч пелагических креветок в северо-восточной Атлантике Э.Н. Херринг определил, что биолюминесценция свойственна 73 % видов каридных и 63 % пенеидных креветок. В слое 0 – 500 м он обнаружил способность к свечению у 88 % особей каридных и 76 % пенеидных креветок, в слое 500 – 1000 метров – 87 % и 41 %, а глубже 1000 метров – 86 % и 13 % соответственно. Таким образом, с увеличением глубины относительная численность *Caridea* остается на одном уровне, а *Pemaeidea* падает [3].

Оболочники – *Urochordata*. В этой подгруппе светящиеся животные обнаружены в классах *Thaliacea* (пирсомы, долиолиды, сальпы) и *Larvacea* (ойкоплеуры) [3].

Свечение *Pyrosoma* происходит лишь в ответ на раздражение и имеет рефлекторный характер. Имеет бимодальный характер спектральных характеристик светоизлучения организма: основной максимум светоизлучения наблюдается в области 482 нм и вторичный 525 нм [3].

Замечательное свойство ойкоплеур заключается в том, что светиться могут не только сами животные, но и их брошенные домики. Свечение домиков может продолжаться в течение четырех часов после того, как животные их покинут. Это свойство ойкоплеур позволяет считать, что они могут вносить существенный вклад в формирование биолюминесцентного поля пелагиали океана [3]. В Калифорнийском заливе Галт наблюдал концентрации *Oikopleura dioica* и способных к свечению домиков около $10^4 - 10^5$ экз/м³, причем эти

организмы были единственными источниками биолюминесценции в этом районе [цитируется по 3].

Рыбы – *Teleostei* [*Crardata* (= *Vertebrata*)]. Свечение широко распространено среди рыб, особенно среди обитателей больших глубин. Около 98 % всех глубоководных рыб имеют фотогенные органы того или иного типа [3].

По данным, полученным в районе Бермудских островов, на глубинах от 700 до 5500 м светятся 39 % всех семейств рыб, 81 % всех родов, 66 % всех видов и 96 % всех особей. К настоящему времени описано около 300 видов светящихся рыб, из которых 18 относится к хрящевым, остальные к костным рыбам, причем примерно у 50 видов последних есть симбиотические бактерии, остальные светятся самостоятельно [3].

Рассмотрев список представителей светящихся растений и животных, можно сделать вывод, что среди морских организмов нет ни одной крупной систематической группы, в которой не встречались бы светящиеся виды, кроме некоторых пресмыкающихся и млекопитающих [3]. В настоящее время известно более 800 светящихся видов, и этот список продолжает пополняться [3].

Рассмотрим региональные сообщества биолюминесцирующих гидробионтов, существующие в Черном, Баренцевом и Норвежском морях.

Норвежское и Баренцево море. Эти моря сильно гетерогенны по водным массам и, соответственно, видовой состав планктонного сообщества достаточно беден. Кроме того, наблюдается ярко выраженная сезонная сукцессия планктонного сообщества. Но даже в этих неблагоприятных условиях биолюминесцентный анализ с приемлемой точностью может использоваться для оценки численности и биомассы зоопланктона в достаточно большой промежуток времени (апрель – август) и на обширной гетерогенной акватории. Использование биолюминесценции для оценки характеристик фитопланктонного сообщества ограничено вследствие сезонной сукцессии, в ходе которой процент численности светящихся клеток

меняется на три порядка [7].

Светящийся фитопланктон: *Ceratium furca* (рис. 1.1, А), *Ceratium fusus*, *Ceratium longipes*, *Ceratium macroceros*, *Gonyaulax polygramma* (рис. 1.1, Б), *Peridinium brevipes* (рис. 1.1, В), *Peridinium conicum*, *Peridinium grassipes*, *Peridinium curvipes*, *Peridinium depressum*, *Peridinium granii*, *Peridinium Pallidum*, *Peridinium Pellicidum* (рис. 1.2, А), *Actinoigelus ehrenbergii*, *Bacterosira fragilis* (рис. 1.2, Б), *Biddulphia aurita* (рис. 1.2, В), *Chilomonas marina*, *Dinophysis norvegica*, *Distephanus speculum*, *Fragidinium oceanica*, *Fragidinium oceanica v.circul*, *Gymnodinium wulffii*, *Gyrodinium wulffii* [7].

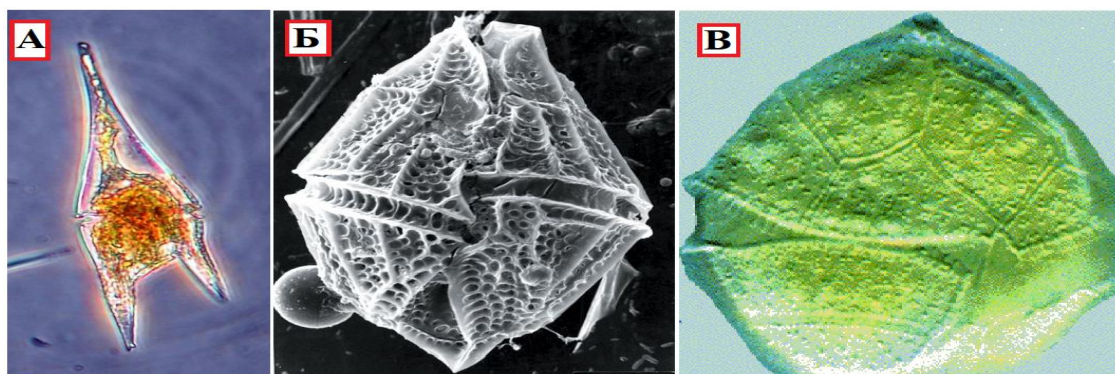


Рисунок 1.1 – Светящиеся виды фитопланктона Норвежского и Баренцево морей: А – *Ceratium furca* [9], Б – *Gonyaulax polygramma* [10], В – *Peridinium brevipes* [11]

Светящийся зоопланктон: *Nauplii Metridia*, *Metridia lucens* (рис. 1.3, А), *Metridia longa* (рис. 1.3, Б), *Oithona similis* (рис. 1.3, В), *Oithona atlantica*, *Oncaea borealis*, *Temora longicornis*, *Nauplii Euphausiacea*, *Euphausiacea spp.* (рис. 1.4, А), *Oikopleura labradoriensis*, *Limacina helicina*, *Limacina retroversa* (рис. 1.4, Б), *Conchoecia obtusata*, *Conchoecia elegans*, *Thysanoessa inermis* (рис. 1.4, В), *Pseudocalanus elongates*, *Microcalanus spp.*, *Acartia spp.*, *Evadne nordmanii*, *Fritillaria borealis*, *Sagitta elegans*, *Hyperiididae juv.*, *Parauchaeta spp.*, *Larvae Polychaeta* [7].

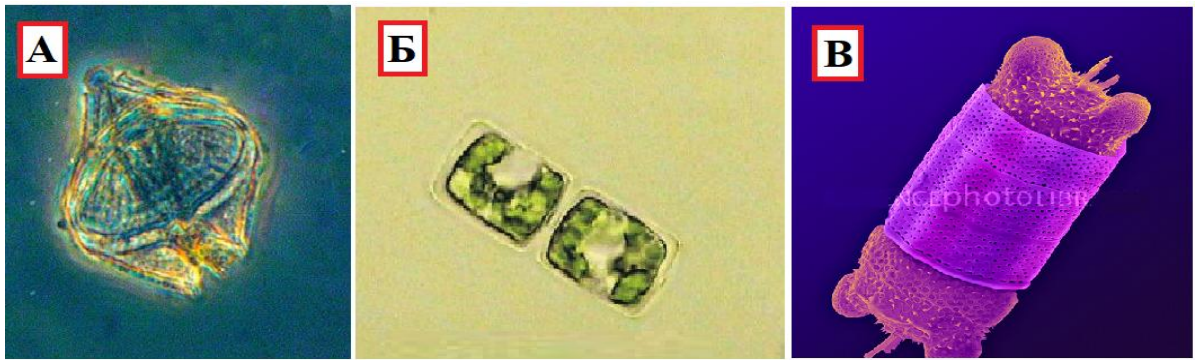


Рисунок 1.2 – Светящиеся виды фитопланктона Норвежского и Баренцево морей: А – *Peridinium Pellicidum* [12], Б – *Bacterosira fragilis* [13], В – *Biddulphia aurita* [14]

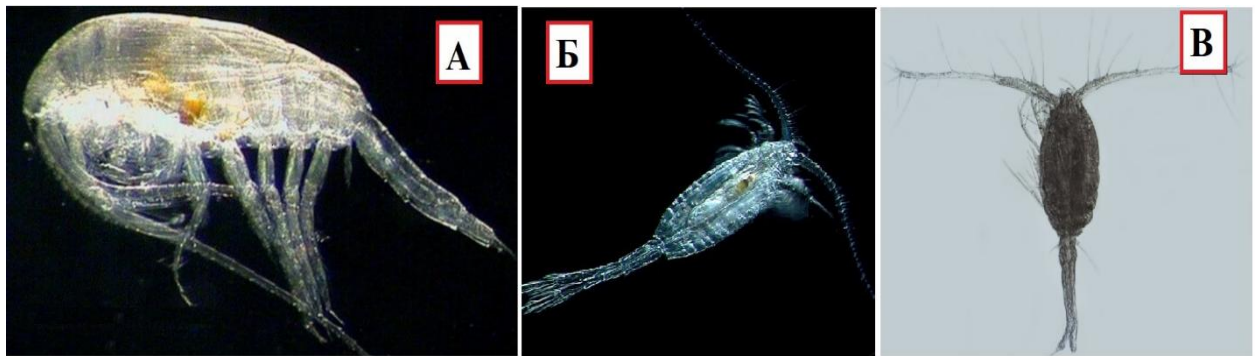


Рисунок 1.3 – Светящиеся виды зоопланктона Норвежского и Баренцево морей: А – *Metridia lucens* [15], Б – *Metridia longa* [16], В – *Oithona similis* [17]



Рисунок 1.4 – Светящиеся виды зоопланктона Норвежского и Баренцево морей: А – *Euphausiacea spp.* [18], Б – *Limacina retroversa* [19], В – *Thysanoessa inermis* [20]

Таким образом, в составе биолюминесцирующего планктонного сообщества Норвежского и Баренцева морей насчитывается порядка 23 видов фитопланктона, 8 представителей из которых относятся к роду *Peridinium*.

Состав биолюминесцирующего зоопланктоного сообщества более разнообразен по видовому составу и насчитывает порядка 24 видов.

Черное море. В отличие от Баренцева и Норвежского морей в Чёрном море видовое разнообразие светящихся видов зоопланктона значительно ниже. Наиболее вероятный источник биолюминесцентного поля в Чёрном море – фитопланктон [8].

Светящийся фитопланктон Черного моря: *Ceratium furca* (см. рис. 1.1, А), *Ceratium Fusus* (рис. 1.5, А), *Ceratium tripos* (рис. 1.4, Б), *Ceratocorys sp.*, *Gyrodinium spirale*, *Gyrodinium sp.*, *Noctiluca miliaris* (рис. 1.5, В), *Peridinium divergens*, *Peridinium Steinii*, *Peridinium trochoideum*, *Polycricos schwartzii*, *Polycricos sp* [8].

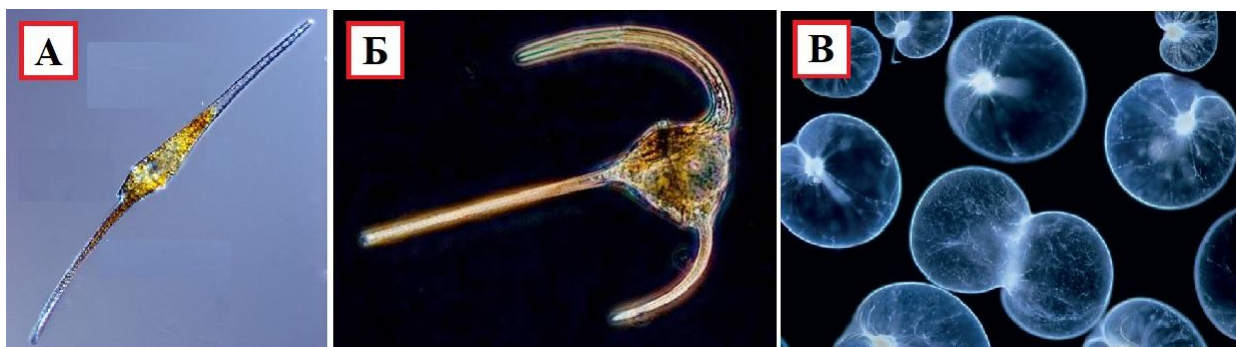


Рисунок 1.5 – Светящийся фитопланктон Черного моря: А – *Ceratium Fusus* [21], Б – *Ceratium tripos* [22], В – *Noctiluca miliaris* [23]

Проведенные исследования показали, что представителями биолюминесцирующего планктонного сообщества Черного моря чаще всего являются 12 видов, наиболее известным и хорошо изученным является *Noctiluca miliaris*.

Сравнение сообществ биолюминесцирующих организмов для рассмотренных морей подчеркивает существенную региональную изменчивость формирования поля биолюминесценции как за счет изменения видового состава, так и за счет различия биомассы светящихся организмов.

1.3 Методы стимуляции

Для получения светового отклика биолюминесцента возможно применение следующих видов стимуляции [4]:

- а) химических;
- б) электрических;
- в) световых;
- г) термических;
- д) ультразвуковых;
- е) механических.

Химический метод стимуляции. Является наиболее простым легкодоступным. Для этого метода нет необходимости в наличие специального оборудования, помимо устройства, регистрирующего свечение. Весь метод заключается в том, что в прозрачную кювету с исследуемым организмом внедряют малое количества (0,3 - 1 мл) какого-нибудь химического реагента, концентрация которого превышает 10%. В качестве подобного реагента можно применять спирт, формалина, ацетон, перекиси водорода, йод и прочее. Спирт, формалин, уксусная кислота, ацетон не оказывают специфичностью воздействия на характеристики светового сигнала, в отличие от солей различных металлов. Концентрация химического вещества влияет на продолжительность светового отклика светящегося организма, причем большая концентрация реагента, вызывает более продолжительное светоизлучение [4].

Данный метод обладает значительным уровнем надежности: стимуляция хим. реагентами способствует люминесценции даже тогда, когда иные методы не могут добиться нужного результата. И интенсивность светового отклика,

обычна, стремится к максимальной. В связи с этим данный способ стимулирования излучения света может предоставить понимание о потенциале биолюминесценции организма. В добавок химический метод обширно пользуется для внесения в каталоги видов биолюминесцентных организмов и при исследовании спектральных параметров излучения [4].

Но необходимо заметить, что вследствие воздействия химических реагентов организм, как правило, погибает. Это явный недостаток данного метода. Также к минусам можно добавить и присутствие механического стимулирования при введении какого-либо химического реагента, что делает неосуществимыми попытки отделить химическое и механическое стимулирующие воздействия при малой концентрации химического вещества. Помимо этого, при влиянии химическими веществами крайне трудно фиксировать время начала раздражения; четкая регистрация реобазы также существенно осложнена. Поэтому метод стимулирования химическими реагентами, хоть и является одним из главных методов исследования биолюминесценции организмов, не способен дать подробной информации обо всех тонкостях подобных процессов [4].

Электрический метод стимуляции. Данный метод стимулирования обладает общей физиологической основой с люминесцирующими организмами, а также этот метод даёт возможность выбрать нужные характеристики стимулирующих импульсов, по мощности и по продолжительности, исследовать латентный период проявления вспышек, с достаточной точностью отследить динамику сигналов биолюминесценции, и изучить промежуток восстановления субстрата при величинах тока, которые не способны навредить организмам. Стимуляция биолюминесцентных происходит или разрядом конденсатора, или от работающих в режиме постоянного тока стимуляторов электронного типа [4].

Электрическое возбуждение бывает внутренним, в этом случае электроды вводят прямо в клетку. А бывает внешним, когда организм помещается между двумя электродами. При внутреннем возбуждении, в результате пропуска

гиперполяризующего стимула через электроды на мембране создается потенциал действия, и у клетки формируется световая вспышка. Но использование внутриклеточных электродов означает некоторые методические сложности. Первое – нужно обездвижить организм, что достаточно трудно и не дает возможности провести быстрый анализ параметров биолюминесцентного излучения. Второе – внедрение микроэлектродов создает повреждения у организма. Третье – данный способ годится только для работы с клетками довольно крупных динофлагеллят. В связи с этим обычно используется метод внешней стимуляции, ввиду своей относительной простоты. Но необходимо отметить, что плотность тока в различных областях рабочей камеры обязана быть одинакова, чего добиваются благодаря особой форме [4].

Самой удачной является кювета. Это сосуд прямоугольной формы из прозрачного материала, при этом металлические электроды располагаются на противоположных стенах сосуда и одинаковы им по площади. Подобное размещение электродов обуславливает присутствие плоскопараллельного поля, которое позволяет измерять плотность тока при разных показателях силы тока импульса. Но и подобная конструкция рабочей камеры не смогла избежать единого недостатка всех камер для электрической стимуляции, который заключается в следующем: увеличение плотности тока приводит к поляризации электродов и искажению поля в кювете. Помимо этого, вода – хороший проводник, а у клетки высокое сопротивление, что вызывает эффект огибания (шунтирования) организма и создает провальные попытки стимуляции биолюминесцентных организмов [4].

Световой метод стимуляции. Также были произведены попытки использовать источник когерентного света для возбуждения динофлагеллят. В данном опыте применялся лазер с длиной волны 560 ± 30 нм. Световой пучок сосредотачивался линзой радиусом от 1 до 1,5 мм, энергетическая плотность составляла $0,89$ Дж*см². Суспензия, в которой находились клетки крупной динофлагелляты *Pyrocystis lunula*, показала яркую биолюминесценцию в результате раздражения светом. Однако исследователи, которые предложили

данный метод, заметили, что непонятно, свечение организмов — это реакция на лазерный импульс или возбудителем излучения был ультразвук, который образовался при взаимодействии лазерного луча с водой, а может два эти фактора действовали одновременно [4].

Ультразвуковой метод стимуляции. Ультразвуковые волны также использовались в попытках получения биолюминесцентных реакций. Одиночные клетки динофлагеллят подвергались стимуляции ультразвуком. Источником ультразвуковых волн при этом был пьезокерамический кристалл, который подводили прямо к клетке. В других случаях стимулирующим воздействием выступали ультразвуковые импульсы частотой 880 кГц. Ультразвуковой излучатель давал возможность менять мощность импульса от 0,02 до 2,00 Вт*см², а продолжительность – от 1 мс до достаточно большого временного отрезка [4].

Механический метод стимуляции. Данный способ используется при измерении биолюминесцентного излучения *in situ*. В качестве стимулирующего импульса выступает движение воды, например: интенсивное ветро-волновое перемешивание вод во время шторма, в зоне прибоя, при перемещениях крупных млекопитающих, создающих поток воды, среди способных к биолюминесценции планктонных организмов, свечение может возникнуть даже при резком рывке копеподы во время охоты. В условиях лаборатории данный метод реализуется путем создания потока воды в сосуде с организмами, способными светиться, при помощи электромеханического аппарата. Изменение гидрофизических параметров, формирующихся при передвижении водной массы приводят к деформированию клеточной мембраны исследуемого организма, которая способствует появлению излучения света [4].

Восприимчивость большинства динофлагеллят к механической стимуляции обладает характерной циркадной ритмикой. [4].

Подводя итог вышесказанного, можно сделать вывод, что биолюминесценция довольно сильно распространена среди морских организмов. При этом существует значительная региональную изменчивость

формирования поля биолюминесценции как за счет изменения видового состава, так и за счет различия биомассы светящихся организмов.

Одна из главных особенностей биолюминесценции заключается в необходимости раздражающего действия для получения свечения. На сегодняшний день существует немалое количество методов стимуляции свечения, каждый из которых имеет свои достоинства и недостатки. Наиболее распространенным является механический метод, но он имеет ряд недостатков, которые отсутствуют в ультразвуковом методе.

2 Методы и средства проведения исследования биолюминесценции

2.1 Методы исследований свечения моря

Всю историю исследования биолюминесценции планктонных организмов можно разделить на три периода:

- период визуальных наблюдений свечения моря;
- инструментальное измерение свечения;
- лабораторные измерения биолюминесценции.

2.1.1 Визуальные наблюдения свечения моря

Биолюминесценция издавна удивляла людей, об этом явлении упоминали Аристотель и Плиний; оно постоянно фиксировалось в журналах мореплавателей (в том числе и военного врача русского флота Ф.Д. Дербек), естествоиспытатели также проявляли к нему интерес (Ч. Дарвин), оно приносило вдохновение писателям (К.Г. Паустовский) [24].

Данные примеры из художественной и специальной литературы, не только дают представление о необычной силе и красоте свечения моря, но и дают возможность проследить некоторые его характерные особенности [24].

Особенность биолюминесценции заключается в том, что оно появляется только под действием какой-либо внешней возбуждающей причины, например, цунами или волнение моря, удары прибоя о берег, движение судна [24].

Еще одна значимая особенность свечения моря заключается в его непостоянстве. Излучение может быть достаточно сильным в одном районе моря практически отсутствовать в другом, проявляться в конкретное время года и пропадать в другое. Также свечение зависит от большого количества неустойчивых факторов, таких как состояние поверхности моря, фазы луны,

течений и других [24]. Все это определяет сложность проведение замеров и получение сопоставимых количественных данных о величине биолюминесцентного излучения моря.

Достаточно просто осознать, как сильно неустойчивость излучения и его взаимосвязь от внешнего стимулирующего воздействия делает сложным проведение замеров и получение сопоставимых количественных сведений, с которых обязано брать свое начало любое научное исследование [24].

Для того чтобы справиться с данными проблемами, Н.И. Тарасов создал стандартизированный метод наблюдения за биолюминесценцией моря невооруженным глазом, который в 1948 г. был введен Главным управлением гидрометеорологической службы в «Наставления гидрометеорологическим станциям и постам», а также он порекомендовал использовать шкалу, облегчающую сопоставление наблюдений [24].

Возможности визуальных наблюдений ограничены разработкой карт встречаемости излучения и оцениванием его характера по рекомендованной Тарасовым Н.И. «Шкале интенсивности свечения моря» [24].

2.1.2 Инструментальное измерение свечения

С начала 50-х годов получила развитие техника фотоумножителей — электронных приборов, позволяющих в миллионы раз усиливать световой сигнал. Открылась возможность измерения слабых световых потоков вплоть до счета отдельных фотонов. В изучении биолюминесценции фотоумножители стали ключом к пониманию самой сути явления [24].

Американские океанографы Б. Бодеп и Е. Кампа первыми (а вскоре и Дж. Кларк с соавторами) создали на основе фотоумножителей конструкции, которые можно было погружать в море и измерять слабый свет. Приборы получили название батифотометров, т.е. глубинных измерителей освещенности [24].

Биолюминесцентные сигналы, исходящие из моря, были обнаружены

случайно батифотометром — прибором, погруженным на глубину для измерения остаточного солнечного света. Этот прибор был предназначен для измерения чисто физической величины света астрономического происхождения, имеющего очень малую и притом постоянную или медленно меняющуюся интенсивность [24].

Основу любого батифотометра составляет фотоумножитель с системой электропитания и усиления сигнала, помещенный в герметичный корпус. Обязательная деталь корпуса — иллюминатор, через который свет достигает приемной поверхности катода фотоумножителя. Этот основной блок обрастает дополнительными устройствами, в зависимости от задач и условий использования прибора [24].

Батифотометр предназначен для измерения биолюминесценции в толще воды от поверхности до средних глубин в 2—3 тыс. м. Этот прибор используется на достаточно крупных исследовательских судах, имеющих электролебедку и оборудованную лабораторию [24].

Батифотометр первого поколения представлял собой контейнер с фотоумножителем, связанным с бортом электрокабелем. Прибор опускали на заданную глубину и экспонировали обычно несколько минут. В зависимости от района, времени суток и глубины погружения регистрировалось разное количество импульсов [24].

Главная особенность биолюминесценции, о которой уже говорилось выше, состоит в том, что невозбужденные живые организмы почти или совсем не светят [24].

В связи с этим фактом мысль конструкторов обратилась к созданию приборов, максимально возбуждающих свечение в поле зрения батифотометра. Дж. Кларк использовал батифотометр с насосом. Вспышки регистрировались в струе воды, пронесившейся мимо иллюминатора прибора.

Вскоре А.П. Шевырногов разработал конструкцию с активным возбуждением биолюминесценции. В его приборе можно измерять суммарное свечение струи или регистрировать импульсы от одиночных животных,

проносящихся в потоке, измерять их интенсивность, длительность и время запуска световой реакции (рис. 2.1) [24].

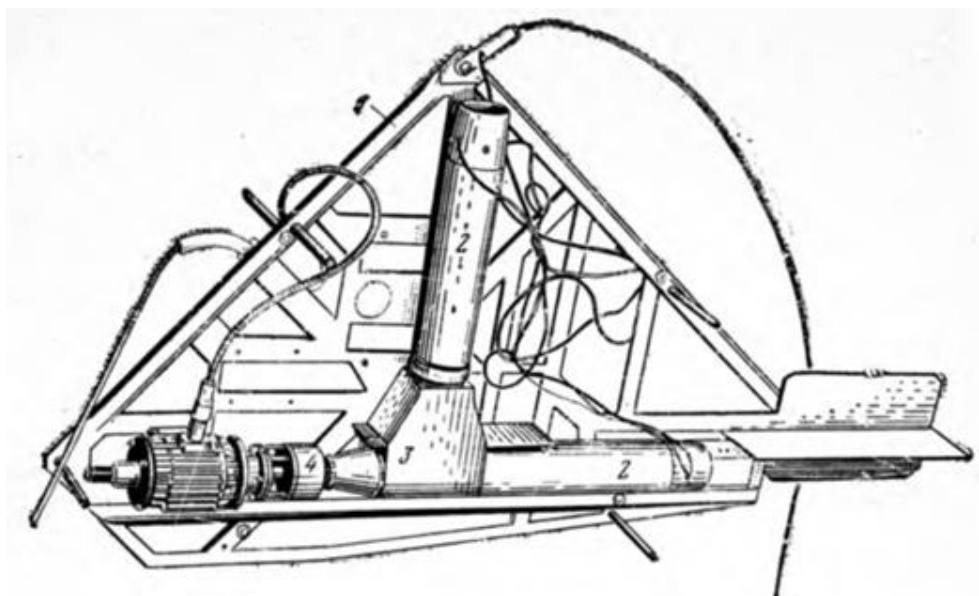


Рисунок 2.1 – Батифотометр с активным возбуждением [24]

Иную конструкцию предложил Г. М. Карабышев. В его батифотометре нет камеры и насоса. Мотор вращает в поле зрения батифотометра конструкцию вроде колеса с лопастями, как у старых пароходов, только гораздо меньшего размера. Вокруг светящегося колеса образуется ореол, интенсивность свечения которого измеряется батифотометром и характеризует биолюминесцентный потенциал исследуемого района [24].

У всех описанных приборов свечение возбуждается механическим путем. В отличие от них, в приборе японского исследователя Н. Нешиба для возбуждения свечения используется ксеноновая лампа-вспышка. Ученый исходил из представления о том, что светящиеся животные возбуждают друг друга световыми вспышками [24].

Интересный гибридный инструмент разработан Дж. Кларком и известным американским фотографом-натуралистом У. Эджертоном. Их прибор представлял собой комбинацию из батифотометра, лампы-вспышки и

фотографической камеры. Импульс от случайно попавшего в поле зрения батифотометра животного преобразовывался фотоумножителем и электронной схемой в электрический сигнал и запускал лампу-вспышку. Нацеленная в то же поле зрения камера фотографировала изображение животного. После вспышки фотопленка протягивалась на один кадр, и вся система снова была готова к действию. На практике эта красивая идея, к сожалению, не осуществилась в виду того, что большинство излучающих организмов имеет микроскопические размеры, поэтому камера не давала их изображения [24].

Для спуска батифотометра на глубину более 3 – 4 км понадобилась разработка специального варианта прибора, который был построен Л.А. Левиным и А.П. Шевырновым. Для него были изготовлены титановые контейнеры, рассчитанные на давление до 1500 атм. Прибор размещался в двух контейнерах: в одном — батифотометр и вся схема регистрации, в другом — лампа-вспышка для возбуждения свечения. Прибор опускали глубоководной лебедкой на стальном тросе. Его работа обеспечивалась и управлялась закладываемой перед погружением программой. Задавались интервалы и длительность регистрации на каждой глубине, ритм работы лампы-вспышки. Общая длительность программы была рассчитана на 8 часов. Световые импульсы регистрировались портативными магнитофонами. Этим прибором, вид которого представлен на рисунке 2.2, выполнено несколько измерений в глубоководных впадинах Тихого океана [24].



Рисунок 2.2 – Зондирующий батифотометр [24]

Из числа разработанных способов замера биолюминесцентного сигнала в толще воды (зондирование конкретных слоев, буксировка и вывешивание на определенном горизонте фотометров, и их монтаж на дно с использованием специализированных ферм и т.д.) долгое время самыми надежными и перспективными являются методы буксировки и зондирования. Сущность данных способ измерений заключается в регистрировании излучения организмов батифотометром, который движется с постоянной скоростью. Но метод буксировки можно применять лишь во время движения судна, причем количество горизонтов ограничено, обычно в районе верхних 10 м. Сущность метода зондирования заключается в поднимании с постоянной скоростью (или опускании) батифотометра в конкретном слое (чаще всего это верхний продуктивный (0-200 м) или фотический (0-100 м) слои) в дрейфе судна [1].

Благодаря достаточно простым и надежным буксируемым фотометрам удалось провести сравнительный анализ интенсивности биолюминесценции приповерхностного слоя Атлантического и Индийского океанов, а также морей Средиземноморского бассейна [1].

Невзирая на значимость и перспективность методики буксировки фотометра, в частности, для экспресс-оценивания пространственного распределения биолюминесценции и некоторых связанных с нею биологических характеристик, ряд присущих этому методов недостатков, а именно – зависимость уровня возбуждения светоизлучения гидробионтов от скорости судна, воздействие астрономической освещенности на величину измеряемого биолюминесцентного потенциала, влияние волнения моря (качки судна), и, наконец, возможность исследования только приповерхностного слоя (1-10 м) – накладывает определенные ограничения на его использование [1].

Именно поэтому в последние 20-25 лет предпочтение при изучении биолюминесценции отдано зондирующему методу [1].

Впервые измерения движущимся батифотометром в режиме зондирования проводили Б. Бодеп и Е. Камка в США, а в СССР Ю. А. Рудяков

из Института океанологии. Не использовалось никаких дополнительных возбуждающих устройств. В качестве раздражителя у данного прибора выступал его корпус. Позже Э.П. Битюков из «ИнБЮМ» увеличил стимулирующее воздействие, внедрив вначале иллюминатора собственного батифотометра решетку. Из-за приведения в движение батифотометр побуждал интенсивное излучение планктонных организмов на решетке. Но батифотометр с подобным конструктивным решением имеет значительный недостаток – он не защищен от астрономического фона, это в свою очередь накладывает ограничение на использование этого прибора днем на верхних горизонтах. Данный ограничение является весьма важным, так как судно, проводящее исследование, не имеет возможности проводить измерения только в ночное время суток. Лабораторией фотобиологии была выполнена попытка совместить в единой системе батифотометра свойства защиты от астрономического фона и механической стимуляции. Его принцип действия виден на рисунке 2.3 [24].

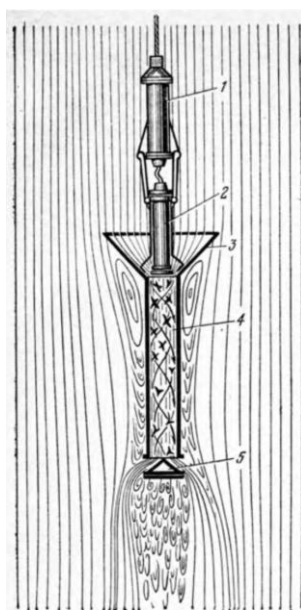


Рисунок 2.3 – Схема зондирующего батифотометра [24]: 1 – вспомогательный аппаратный контейнер; 2 – контейнер с фотоумножителем, обращенный иллюминатором вниз; 3 – захватывающий конус; 4 – проточный цилиндр, в котором измеряется свечение животных в турбулентном потоке; 5 – световой

экран

Прибор состоит из двух частей: погружаемой и бортовой. На борту в лаборатории находится источник электропитания, схема управления и регистрации сигнала. За борт выводится герметичный корпус, внутрь которого помещен фотоумножитель с электронной схемой, обеспечивающей его работу. Забортная и бортовые части связаны между собой кабелем-тросом, который выполняет две функции: механически удерживает прибор за счет прочной наружной стальной оплетки и передает по спрятанным в сердцевине проводам электропитание для фотоумножителя и его сигнала. Спуск и подъем прибора выполняются с помощью лебедки, имеющей коллектор, который позволяет измерять сигнал непрерывно во время движения батифотометра в режиме зондирования. На корпус батифотометра одевается темновая камера, защищающая фотоумножитель от внешней засветки. Такой прибор регистрирует только световые вспышки животных, попавших внутрь камеры. Их свечение возбуждается гидродинамически: внутри темновой камеры благодаря форме при протягивании прибора лебедкой создается зона турбулентности, возбуждающая свечение [24].

Батифотометры совершили быструю эволюцию от простого фотометра, одетого в водонепроницаемый корпус, до целого семейства специализированных приборов для изучения различных проявлений свечения моря [24].

2.1.3 Лабораторные измерения биолюминесценции

Введение в практику океанографических исследований измерений биолюминесценции зондирующими приборами позволило перейти к систематическому и количественному изучению свечения моря. При изучении биолюминесценции в море налагаются существенные ограничения, связанные с суточной динамикой освещенности, сложностью определения вклада различных видов организмов в суммарное свечение. Поэтому параллельно с

методами измерений биолюминесценции в море разрабатывались методы лабораторных измерений [25].

Измерения биолюминесценции планктонных проб как природных популяций, так и монокультур светящихся видов фитопланктона применяются многими исследователями для изучения тонких регуляторных механизмов и особенностей этого явления. Распространенное использование и достоинства этих методик объясняются возможностью исследовать эндогенные и экзогенные ритмы свечения, закономерности возбуждения, влияние физических и химических факторов на свечение организмов при точном учете качественного и количественного состава планктона в пробах. В то же время различия в устройствах, обеспечивающих возбуждение свечения организмов (механических вибраторов, пузырьковых камер, центробежных насосов), отсутствие оценки интенсивности стимуляции и ее неравномерность как в исследуемом объеме, так и во времени существенно осложняют количественную оценку и сопоставление результатов измерений. При более точной калибровке стимуляции эти недостатки могут быть в значительной мере устранены [25].

В исследовании, которые провели А.П. Шевырнов [26], В.С. Филимонов [5] и Н.А. Тюлькова [5] была показана возможность количественного изучения биолюминесценции отдельных планктонных организмов при стимуляции свечения ультразвуком. Полученные результаты позволили предположить, что способ ультразвукового возбуждения может быть использован для количественного изучения биолюминесценции гетерогенных популяций планктона и связи характеристик свечения с видовым составом и численностью светящихся организмов.

2.2 Обзор и анализ существующих батифотометров

На сегодняшний день был разработан обширный ряд приборов, измеряющих биолюминесценцию. Рассмотрим некоторые из них, для выделения конструктивных особенностей, которые помогут в разработке нового батифотометра.

Универсальный биолюминесцентный батифотометр (Multipurpose Bioluminescence Bathyphotometer (MBVP)) (рис. 2.4) [27].

MBVP разработан в первую очередь для изучения биолюминесценции в прибрежных зонах. Этот компактный автономный батифотометр предназначен для работы в различных режимах развертывания, включая обычные профилировщики на судах, буксируемые платформы, автономные подводные аппараты (AUV) и профилирующие швартовы.



Рисунок 2.4 – Универсальный биолюминесцентный батифотометр (MBVP) [27]

Во всех конфигурациях прибор сохраняет сигнальную структуру с разрешением от сантиметра до метра, масштаб, при котором приборы с более высоким расходом могут нарушать тонкие слои и другие мелкомасштабные характеристики водяного столба. В MBVP морская вода поступает с минимальным предварительным возбуждением в камеру стимулирования светоизлучения и его измерения при непрерывном измерении расхода 350 – 400 мл/с. Фотоумножитель (PMT) регистрирует излучение от биолюминесцентных организмов после механического стимулирования на входе в камеру импеллерным насосом. Были разработаны протоколы

калибровки и испытаний для определения эффективности стимуляции и характеристик измерения МВВР [27].

На рисунке 2.5 стрелки и метки на видах В и С показывают поток воды через инструмент. Вода проходит через впускной канал, вокруг светоотражателя, через гладкий насос крыльчатки лопасти и вниз в камеру возбуждения РМТ. РМТ позиционируется для просмотра объема камеры возбуждения. Затем воду закачивают вверх из камеры через расходомер, вокруг второй световой перегородки и вытесняют через выпускной порт [27].

Краткие технические характеристики МВВР представлены в таблице 2.1.

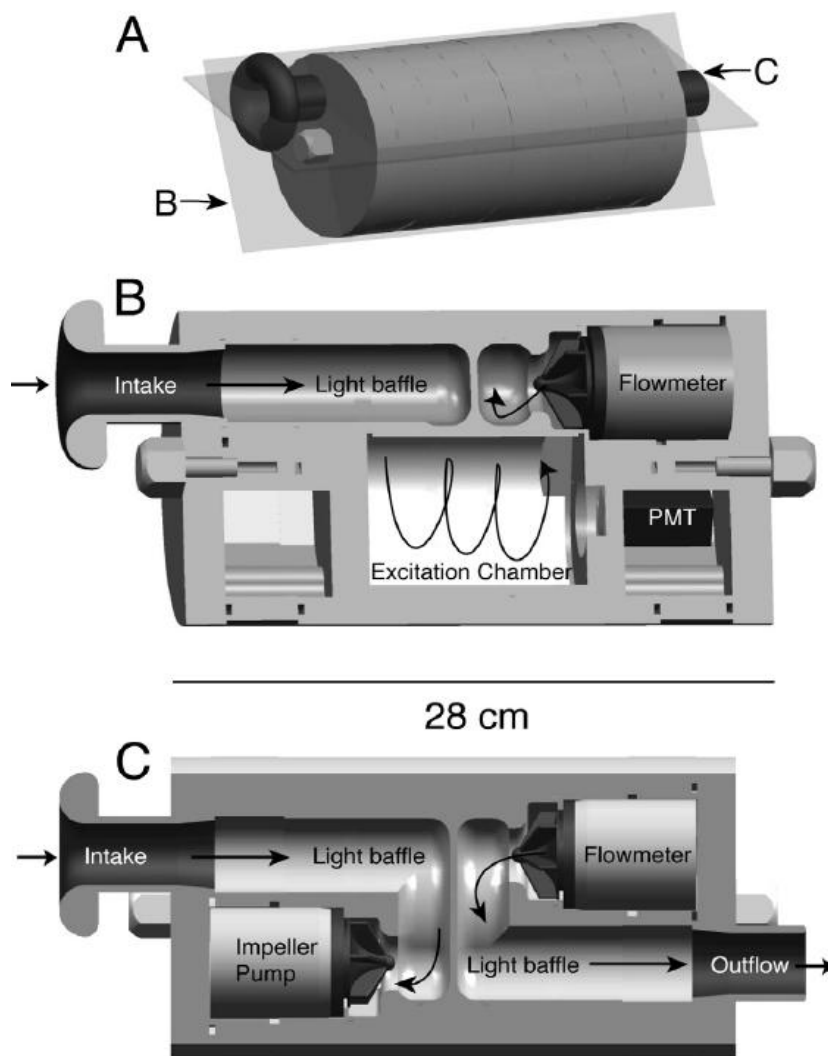


Рисунок 2.5 – Трехмерная диаграмма *MBBP* (А), с наклонными серыми плоскостями, пересекающая прибор, чтобы показать ориентацию разрезанных видов: (В) вид сбоку и (С) вид сверху [27].

Таблица 2.1 – Краткие технические характеристики универсального биолюминесцентного батифотометра (МВВР) [27]

Устройство для стимуляции	Импеллерный насос
Устройство регистрации свечения	Фотосенсор Намамatsu (H5783)
Объем измерительной камеры, V(л)	0,5
Объемный расход, Q (л/с)	0,45
Резидентное время вспышек в пределах камеры обнаружения батифотометра, T (с)	1,1
Глубина погружения	до 200 м

Инструмент оценки подводной биолюминесценции UBAT (Underwater Bioluminescence Assessment Tool) (рис. 2.6) [28].

U-BAT представляет собой небольшой, легкий, адаптируемый к платформе датчик биолюминесценции для использования в прибрежных и открытых океанических средах. WET Labs разработала коммерчески доступную биолюминесцентный датчик, разработанный на основе технологии многофункционального биолюминесцентного батифотометра третьего поколения (МВВР-G3), разработанной в Университете Калифорнии, Санта-Барбара (UCSB). UBAT обеспечивает масштабируемую, надежную и точную меру механически стимулированного потенциала биолюминесценции в единицах фотонов Γ^{-1} , способных измерять мелкомасштабное вертикальное разрешение менее 1 м [28].



Рисунок 2.7 – Инструмент оценки подводной биолюминесценции UBAT [28]

UBAT не регистрирует данные внутренне, поэтому для регистрации данных требуется либо главный компьютер с программой эмулятора терминала, либо программное обеспечение, входящее в UBAT. Графический пользовательский интерфейс WET Labs и программное обеспечение для управления UBAT обеспечивают окно просмотра данных, ведение журнала данных и отслеживание проверки. Используя программное обеспечение UBAT, данные могут сохраняться непрерывно с автоматическим именованием файлов [28].

Краткие технические характеристики UBAT представлены в таблице 2.2 [28].

Таблица 2.2 – Краткие технические характеристики инструмента оценки подводной биолюминесценции UBAT [28]

Устройство для стимуляции	Импеллерный насос
Устройство регистрации свечения	Электронный фотоумножитель
Объем измерительной камеры, V(л)	0,44
Объемный расход, Q (л/с)	0,3
Резидентное время вспышек в пределах камеры обнаружения батифотометра, T (с)	1,467
Глубина погружения	до 600 м

Батифотометр GlowTracka. Батифотометр Glowtracka (рис. 2.8) от компании Chelsea Technologies Group Ltd первоначально был разработан Плимутской морской лабораторией в Великобритании, представляет собой надежный чувствительный детектор, используемый в основном для оценки биолюминесцентных водорослей в морской среде [29].

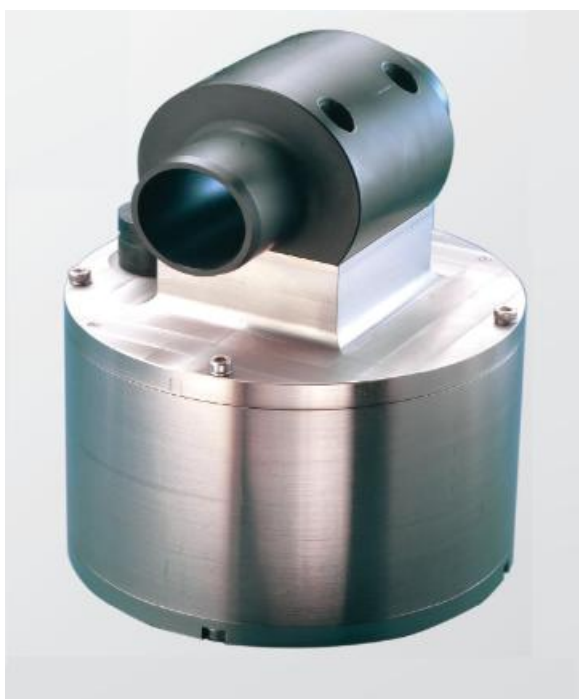


Рисунок 2.8 – Батифотометр GlowTracka [29]

Батифотометр Glowtracka от компании Chelsea Technologies Group Ltd первоначально был разработан Плимутской морской лабораторией в Великобритании, представляет собой надежный чувствительный детектор, используемый в основном для оценки биолюминесцентных водорослей в морской среде [29].

Батифотометр Glowtracka является надежным, чувствительным детектором, который в основном используется для оценки биолюминесцентных водорослей в морской среде. Он идеально подходит для исследований биомассы и обнаружения цветения токсичных водорослей. Высокоточный расходомер GlowTracka стимулирует биолюминесцентные организмы - в основном динофлагелляты. Затем прибор измеряет световые вспышки, когда организмы проходят детектор. Измеряется полный диапазон вспышек, который может произойти - от отдельных событий до мезомасштабных [29].

Измерения показывают изменения первичной продуктивности в районе, что целесообразность его использования при мониторинге загрязнения вод [29].

Краткие технические характеристики батифотометра GlowTracka представлены в таблице 2.3.

Таблица 2.3 – Краткие технические характеристики батифотометра GlowTracka [30]

Устройство для стимуляции	Сетка
Устройство регистрации свечения	Фотодиод (100 мм ²)
Объем измерительной камеры, V(л)	0,012
Объемный расход, Q (л/с)	0,1
Резидентное время вспышек в пределах камеры обнаружения батифотометра, T (с)	0,123
Глубина погружения	до 1000 м

Комплекс гидробиофизический зондирующий «Сальпа-М» (рис. 2.9) [31], производства компании Hydrooptics ltd. и НПП «Аквастандарт-Юг».



Рисунок 2.9 – Гидробиофизический комплекс «Сальпа-М» [31]

Зонд «Сальпа-М – ГБФ» используется для исследования интенсивности биолюминесцентного излучения организмов в деятельном слое Мирового океана (0-100 м) в режиме многократного вертикального со скоростью 1,2 м/с и горизонтального (буксировка) зондирования со скоростью до 7 км/ч [31].

Краткие технические характеристики «Сальпа-М – ГБФ» представлены в таблице 2.4 [31].

Таблица 2.4 – Краткие технические характеристики «Сальпа-М – ГБФ» [31]

Устройство для стимуляции	8 лопастных импеллеров
Устройство регистрации свечения	ФЭУ-71
Объем измерительной камеры, V(л)	20
Объемный расход, Q (л/с)	-
Резидентное время вспышек в пределах камеры обнаружения батифотометра, T (с)	-
Глубина погружения	до 100 м

Батифотометр «HIDEX-II». Батифотометр «HIDEX-II» (2.10) был первоначально разработан Калифорнийским университетом в Санта-Барбаре и стал стандартным инструментом измерения биолюминесценции ВМС США. Данный прибор был разработан с измерительной камерой большого объема, которая позволила минимизировать возможность зоопланктона избежать регистрации его свечения [32].



Рисунок 2.10 – Батифотометр «HIDEX-II» [32]

Краткие технические характеристики «HIDEX-II» представлены в таблице 2.5 [32].

Таблица 2.5 – Краткие технические характеристики батифотометра HIDEX-II [32]

Устройство для стимуляции	Сетка
Устройство регистрации свечения	78 оптических каналов и один общий фотоумножитель
Объем измерительной камеры, V(л)	11,3
Объемный расход, Q (л/с)	16-44
Резидентное время вспышек в пределах камеры обнаружения батифотометра, T (с)	0,513
Глубина погружения	500 м

Анализ существующих приборов. Существующие проекты батифотометров существенно различаются по показателям объемного расхода, резидентного времени вспышки, эффективности системы возбуждения биолюминесцентных организмов. Существуют различия в конструктивных особенностях, типах светочувствительного датчика, методике измерений и калибровки. Кроме того, большая часть существующих батифотометров представлена в единичных экземплярах. Появление на рынке таких коммерчески доступных батифотометров как Underwater Bioluminescence Assessment Tool (UBAT) от компании WET Labs, GLOWtracka от компании Chelsea Technologies Group или Сальпа-М2 от НПП Аквастандарт возможно приведет к увеличению количества взаимно сравнимых результатов исследований по измерению морского биолюминесцентного потенциала [6].

При проектировании батифотометра надо учитывать, что измеряемый батифотометром БПБ зависит от объемного расхода жидкости, длительности обнаружения излучения биолюминесцентных организмов в пределах светонепроницаемой камеры обнаружения батифотометра, эффективности

системы гидромеханического возбуждения, минимизации предварительного возбуждения, конструктивных особенностей светонепроницаемой камеры и чувствительности датчика излучения [6].

Основные характеристики существующих батифотометров, которые были представлены в предыдущем разделе, приведены в таблице 2.6.

Таблица 2.6 – Сравнение некоторых технических характеристик батифотометров; V(л) – объем измерительной камеры, Q (л/с) – объемный расход, T (с) – резидентное время вспышек в пределах камеры обнаружения батифотометра

Название	Устройство для стимуляции	Устройство регистрации свечения	V(л)	Q (л/с)	T (с)	Глубина погружения, (м)
МВВР [27]	Импеллерный насос	Фотосенсор Hamamatsu (H5783)	0,5	0,45	1,1	до 200
GLOWtracka [30]	Сетка	Фотодиод (100 мм ²)	0,012	0,1	0,123	до 1000
U-BAT [28]	Импеллерный насос	ФЭУ	0,44	0,3	1,467	до 600
Сальпа-М – ГБФ [31]	8 лопастных импеллеров	ФЭУ-71	20	-	-	до 100
НІDEX-II [32]	Сетка	ФЭУ	11,3	16-44	0,513	500 м

Все, представленные в таблице 2.6, батифотометры имеют механическую систему стимулирования свечения, которая необходима для проведения исследований биолюминесценции планктонных организмов.

Так же эти приборы отличаются и объемами рабочей камеры, что в свою очередь определяется назначением прибора. Батифотометры с высокими скоростями потока и расходом, такие как НІDEX, были первоначально разработаны для обеспечения оптимальной эффективности захвата в открытом

океане, где биолюминесцентные организмы широко варьируются в изобилии и обладают способностью избегать захвата. В прибрежных водах такие высокие скорости потока и большие инструменты могут скрыть мелкомасштабное распределение биолюминесцентных организмов и затруднить выделение отдельных организмов среди общего биолюминесцентного сигнала. Кроме того, для большинства крупных батифотометров требуются большие суда для развертывания и специальные лебедки, что фактически препятствует их использованию вблизи береговой линии и на небольших мобильных платформах или причалах. Более мелкие приборы с умеренными скоростями потока более подходят для исследований в прибрежных районах, где большая часть биолюминесценции производится динофлагеллатами и популяциями небольшого зоопланктона [27].

Одной из самых важных частей батифотометра является устройство, регистрирующее свечение биолюминесцентных, а как отмечалось ранее, люминесценция микроорганизмов представляет собой малые по интенсивности импульсы световой энергии после их возбуждения, в частности, механическим методом. Поэтому, чаще всего измерение световой энергии осуществляется специальным фотоэлектронным умножителем, который имеет высокую анодную чувствительность. И почти все батифотометры как раз имеют, в том числе и представленные в таблице 2.6, в качестве светоприемного устройства фотоэлектронный умножитель, либо фотосенсор с высокой чувствительностью.

2.3 Результаты лабораторных исследований ультразвукового метода стимуляции

Главная особенность биолюминесценции состоит в том, что невозбужденные живые организмы почти или совсем не светят.

Практически во всех разработанных приборах измерения биолюминесценции применяется механический вид стимуляции (см. табл. 2.7), который может быть реализован при помощи помещения перед измерительной

камерой стимулирующей решетки, либо же использование в конструкции измерительного прибора импеллерного насоса.

Таблица 2.7 – Устройства для стимуляции некоторых существующих батифотометров [6]

Название батифотометра	Устройство для стимуляции
HIDEX-type	Сетка
HIDEX	Сетка
MOORDEX	Насос
ML 91	Конструктивные элементы
EcoleNavale	Сетка
MBBP	Импеллерный насос
GLOWtracka	Сетка
UBAT	Импеллерный насос

Но механический метод стимуляции имеет ряд недостатков, которые отсутствуют в ультразвуковом методе стимулирования биолюминесцентных видов планктонных организмов.

Одним из тех, кто исследовал стимулирующее воздействие ультразвука на планктонные организмы был Шевырнов А.П. В его статье «Характеристики биолюминесцентных импульсов *Metridia Pacifica* при стимуляции ультразвуком» [26] указано, что для возбуждения биолюминесцентной реакции применялся ультразвук (УЗ) докавитационных интенсивностей.

Установка для исследования биолюминесцентной реакции морского планктона имела следующие характеристики: частота УЗ 880 кГц, интенсивность изменялась ступенчато от 0 до 2 Вт/см² [26].

Работы проводились с *Metridia pacifica* в районе Владивостока в августе-сентябре 1967 г. Пробы планктона брали сетью с газом № 38 на удалении 3—5 миль от берега. При проведении экспериментов по механическому возбуждению биолюминесцентной реакции из общей пробы выделяли отдельные светящиеся организмы и помещали в рабочую камеру установки. Сигнал от фотоумножителя записывали на шлейфном осциллографе Н700 и параллельно, для контроля, тот же сигнал подавали на электронно-лучевой осциллограф. Длительность возбуждающего импульса контролировалась запоминающим осциллографом [26].

В ходе эксперимента было выяснено, что результаты ультразвукового воздействия на организм исследуемого животного в зависимости от его интенсивности различны. При интенсивностях 2 Вт/см² в пробе не остается живых организмов, при 1,8 Вт/см² встречаются единичные живые экземпляры, при 1,6 Вт/см² часть организмов погибает, а при 1,4 Вт/см² все неповрежденные при отлове животные остаются живыми. При обработке пробы УЗ интенсивностью в 2,0 Вт/см² животные получают повреждения. У них, как правило, пробит панцирь, видны признаки необратимой денатурации белка, что проявляется в помутнении и обесцвечивании тканей, их хрупкости. Животные после воздействия УЗ теряют подвижность [26].

При возбуждении свечения одиночными импульсами длительностью 100 мсек, первые вспышки свечения появились при интенсивности УЗ 1 Вт/см². В редких случаях наблюдалось высвечивание при интенсивности УЗ 0,8 Вт/см² [6].

Полученные результаты позволили предположить, что имеется зависимость дозы ультразвукового воздействия, вызывающей вспышку

свечения, от интенсивности УЗ. Вероятно, что интенсивность УЗ $1,6 \text{ Вт/см}^2$ наиболее эффективно действует на механизм, вызывающий биолюминесцентную реакцию *Metridia pacifica* [26].

Кроме того, выяснилось, что вероятность высвечивания животного наибольшая при интенсивности УЗ в интервале от $1,6 \text{ Вт/см}^2$ до $1,8 \text{ Вт/см}^2$, при снижении и увеличении интенсивности УЗ вероятность высвечивания уменьшается. Для выяснения этой зависимости было проведено 25 опытов на организмах, взятых в одно время, в одном месте и содержащихся в одинаковых условиях [26].

Была обнаружена зависимость – при увеличении энергии УЗ от $1,4$ до $1,8 \text{ Вт/см}^2$ наблюдается уменьшение количества световых импульсов. Также благодаря полученным результатам можно предположить, что при УЗ интенсивностью $1,4 \text{ Вт/см}^2$ животное дает большое количество слабых световых импульсов, при $1,6 \text{ Вт/см}^2$ – среднее количество (около 5) крупных вспышек и при $1,8 \text{ Вт/см}^2$ – 3-4 слабых импульса [26].

Спустя несколько лет В. С. Филимонов и Н. А. Тюлькова провели эксперимент [5], в ходе которого сравнили результаты ультразвуковой стимуляции с результатами механической стимуляции.

Работы проводили в летний и осенний периоды в бухте Витязь зал. Петра Великого Японского моря. Исследовали восемь видов днофлагеллят, относящихся к родам *Peridinium*, *Pyrophacus* и *Gonyaulax*. Динофлагеллят отбирали под биноклем сетных проб. После двукратной пересадки в стерильную морскую воду их помещали в кюветы по одной клетке и выдерживали не менее 4 ч в условиях, определенных задачами эксперимента. Измерения биолюминесценций производили при температуре, соответствующей температуре воды в море [5].

Лабораторная установка состояла из темновой камеры, защищающей исследуемую пробу и фотоумножитель от внешней засветки; фотоприемника, в

качестве которого был использован фотоумножитель ФЭУ-64, перекрывающий по диапазону спектральной чувствительности спектр исследуемых сигналов; блоков электропитания; ультразвукового генератора и регистрирующих приборов. Камера, в которую помещается исследуемый объект, имела систему температурной стабилизации. Электропитание фотоприемника осуществлялось от высоковольтного регулируемого стабилизированного источника напряжения. Сигнал фотоприемника усиливался малошумящим усилителем постоянного тока с полосой пропусков 10 кГц и регистрировался на электронном запоминающем осциллографе С 1-29 или скоростном самопишущем приборе с шириной полосы частот регистрируемых сигналов от 0 до 100 Гц. Конструкция темновой камеры позволяла производить смену кювет с организмами на свету без выключения питания фотоумножителя [5].

Для стимуляции биоломинесценции использовали импульсный ультразвуковой генератор и электромагнитный вибратор, возбуждаемый генератором прямоугольных импульсов с регулируемой амплитудой, длительностью и скважностью. Частота ультразвука 880 кГц. В ультразвуковом генераторе была предусмотрена дискретная и плавная регулировка интенсивности ультразвука от 0,02 до 2 Вт/см² и дискретная регулировка длительности раздражающего стимула от непрерывного излучения до 1 мс. Для ультразвуковой стимуляции организмы помещали в стеклянные кюветы со шлифованным дном объемом 2 см³. Кюветы устанавливали на площадке ультразвукового излучателя, закрепленного в темновой камере на расстоянии 15 см от катода фотоприемника. Для уменьшения отражения ультразвука на контакте кюветы и излучателя дно кюветы смачивали дистиллированной водой и притирали к излучателю [5].

При стимуляции биоломинесценции электромагнитным вибратором использовали прямоугольные кюветы объемом 4 см³. Вибратор находился вне темновой камеры и был связан жестким стержнем с металлической сеткой, размещавшейся при установке кюветы в прибор в ее середине. При

возбуждении вибратора от генератора импульсов в зависимости от режима стимуляции сетка могла совершать колебательные движения с различной амплитудой при разном характере демпфирования колебаний. Собственная частота вибратора около 100 Гц. В большей части экспериментов использовали режим возбуждения колебаний на собственной частоте вибратора, при этом сетка перемещалась от дна кюветы до ее поверхности [5].

Калибровку установки осуществляли по эталонному источнику (люминофор, активированный C^{14}), который размещали по центру расположения кювет с исследуемыми организмами. При регистрации биолюминесцентных импульсов запоминающим осциллографом точность оценки интенсивности свечения эталона составила 5%, скоростным самописцем $\pm 2\%$. Перемещение организмов в кювете изменяло амплитуду сигнала не более чем на $\pm 5\%$. Чувствительность установки 3×10^7 квант/с (падающих на катод) на деление [5].

Амплитуду биолюминесцентного импульса измеряли в относительных единицах от нулевой линии прибора до максимума. За величину длительности вспышки принимали длительность на уровне 0,1 значения амплитуды. Длительность переднего фронта оценивали по времени развития импульса от его возникновения до достижения максимального значения амплитуды [5].

Были получены следующие результаты – на повторяющуюся механическую или ультразвуковую стимуляцию динофлагелляты могут многократно отвечать световыми вспышками, амплитуда которых постепенно уменьшается. В этой работе оценивали характеристики первого ответа, полученного на дискретную стимуляцию. Следует отметить, что клетки реагировали не на каждый поданный стимул; при механическом раздражении на первый стимул отвечало 50% исследованной группы клеток, на второй — 24 и на третий — 6%. Зависимость характеристик импульсов от интенсивности и длительности механических стимулов проследить не удалось, поскольку при

уменьшении интенсивности механического воздействия частота появления ответа на раздражение резко уменьшалась [5].

Реакция клеток динофлагеллят на ультразвуковую стимуляцию, регистрируемая по появлению светового импульса, имеет черты формального сходства с процессами возбуждения. Между интенсивностью и длительностью ультразвукового стимула, вызывающего вспышку света, существует зависимость (рис. 2.11), аналогичная для всех исследованных видов [5].

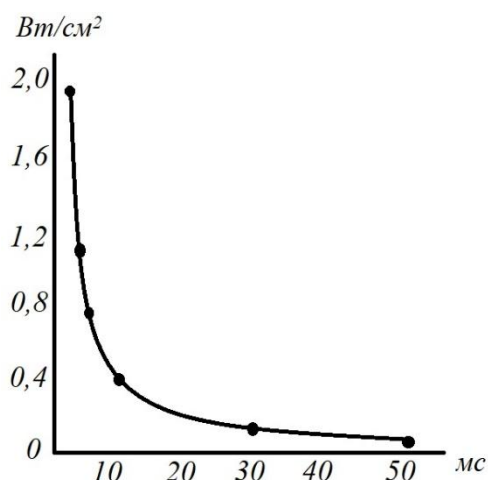


Рисунок 2.11 – Зависимость между интенсивностью и длительностью ультразвукового сигнала, необходимого для возникновения билюминесцентного ответа [5]

Экспериментальная кривая хорошо описывается выражением $I = a / t$, где I – интенсивность ультразвука, t – длительность стимула, $a \approx 3,6 \text{ Вт*мс/см}^2$ – энергия порогового стимула [5].

Порог чувствительности клеток к ультразвуку при длительном раздражении составил для всех исследованных видов $0,02 - 0,06 \text{ Вт/см}^2$, вариации пороговых величин, возможно, определяются физиологическим состоянием организмов. В области малых интенсивностей ультразвука при длительном действии наблюдалась адаптация клеток к раздражителю, что

проявлялось в повышении порога чувствительности при повторной стимуляции. Вероятность появления ответа на ультразвуковую стимуляцию возрастала с увеличением интенсивности и длительности стимула, приближаясь к 100% при значениях 1,2—2,0 Вт/см² и длительности более 30 мс [5].

В надпороговой области ультразвуковой стимуляции биолюминесценции были исследованы амплитуды, длительности, длительности передних фронтов и латентные периоды световых импульсов. Для клеток *Peridium depressum*, *P. crassipes*, *Pyrophacus horologicum* существует градуальная зависимость амплитуды и длительности импульсов от интенсивности и продолжительности раздражающего стимула (рис. 2.12, А) [5].

Амплитуда светового импульса достигает постоянного для данного вида значения при меньших уровнях воздействия, чем длительность импульса. При дальнейшем увеличении силы стимула клетки начинают отвечать многовершинными импульсами или импульсами с размытыми вершинами и ребристыми линиями задних фронтов. Особенно часто подобные импульсы формируются в ответ на стимулы, длительность которых 50 мс и более. Появление подобных импульсов следует считать результатом многократного раздражения [5].

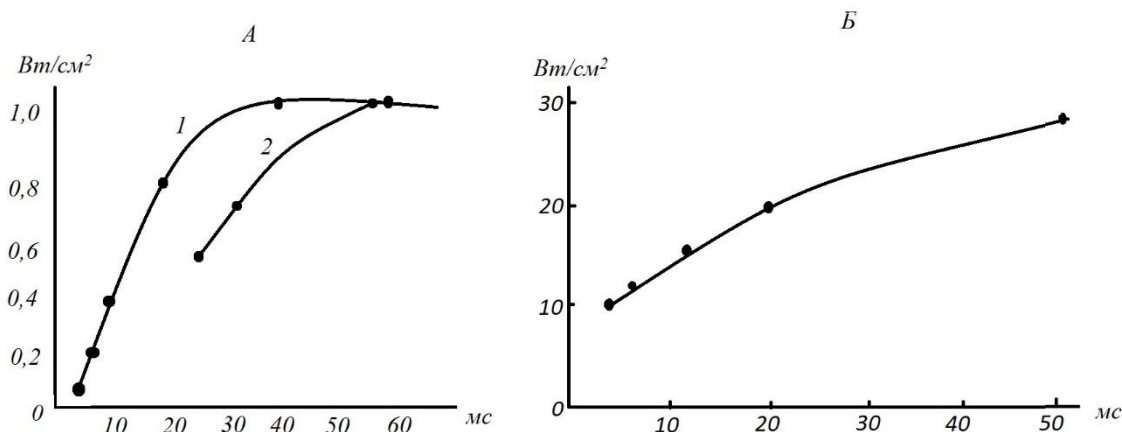


Рисунок 2.12 – Зависимость амплитуды биолюминесцентного импульса (А) от длительности силы ультразвукового раздражения (1 – интенсивность стимула 1

Вт/см², 2 – 0,2 Вт/см²) и латентных периодов биолюминесцентных импульсов (Б) от длительности ультразвукового стимула клеток вида *Peridinium depressum* [5]

В отличие от вышеперечисленных видов, клетки *Peridium pallidum*, *P. globulus*, *Gonyaulax polygramma* не показали отчетливой градуальной зависимости амплитуды светового импульса, тогда как длительность и форма вспышки также меняется в зависимости от параметров раздражения. Следует отметить, что клетки этих видов отличаются меньшими размерами и, кроме того, обнаруживают большую способность к суммации отдельных импульсов при непрерывном действии раздражителя. Появление многовершинных импульсов отмечено также и при механическом раздражении [5].

Существенное влияние параметры ультразвукового стимула оказывают на латентный период биолюминесцентного импульса. Влияние интенсивности стимула сказывается лишь при ее малых значениях (0,2 – 0,6 Вт/см²); при таких значениях ответ появляется на 4 – 6 мс позже, чем при высоких интенсивностях и тех же самых длительностях стимула. При интенсивностях стимула 0,8 – 2 Вт/см² на латентный период оказывает влияние лишь длительность стимула (рис. 2, Б). Длительность механических стимулов могла быть оценена только по времени перемещения вибратора от дна до поверхности кюветы и составила 5 – 10 мс. Латентные периоды при использовании минимальных длительностей раздражения без вычета времени стимуляции составили $10,2 \pm 4$ мс на ультразвуковой стимул длительностью 3 мс и $13,6 \pm 2$ мс на механический стимул. Латентные периоды ответов исследованных клеток различных видов не различаются в пределах погрешности измерений [5].

С целью определения однородности характеристик биолюминесцентных импульсов провели статистический анализ полученных экспериментальных данных. Для некоторых исследованных видов были построены распределения характеристик импульсов, зарегистрированных в различных областях раздражения (рис. 2.13) [5].

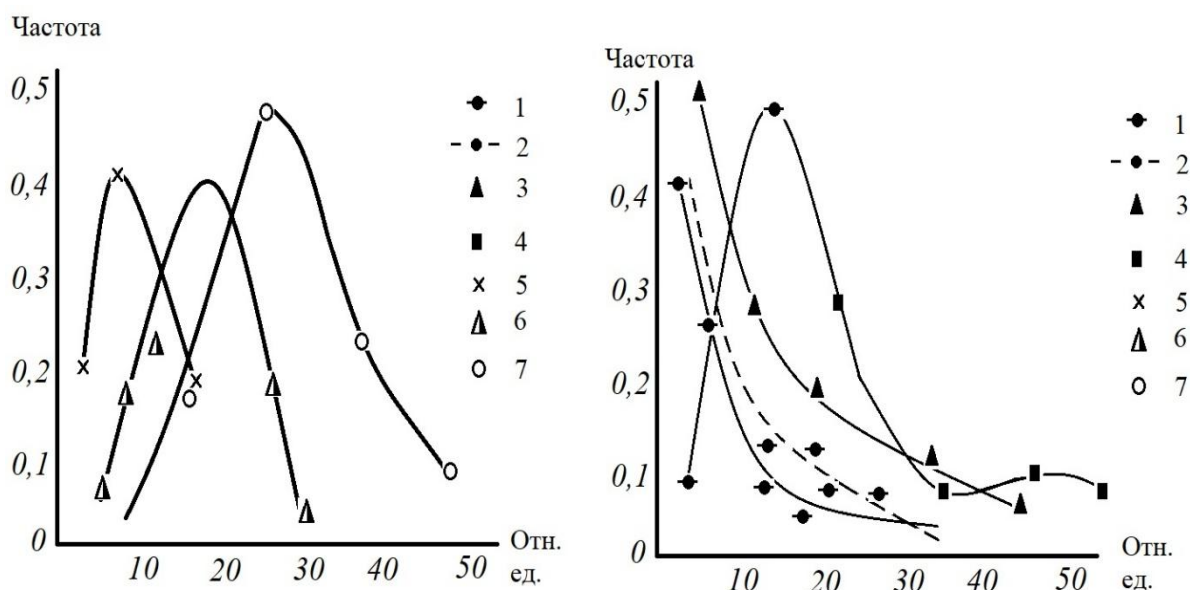


Рисунок 2.13 – Распределение амплитуд биолуминесцентных импульсов при механической стимуляции клеток (1) и стимуляции ультразвуком в близкой к пороговой области (2-3), ультразвуком с длительностью стимула 30 мс (4) и 20 мс (5-7). 1, 2 - *Pyrophacus horologicum*, 3, 4 – *Peridinium depressum*, 5 - *Gonyaulax polygramma*, 6 – *P. pallidum*, 7 – *P. Crassipes* [5]

Амплитуды, полученные в области ультразвукового раздражения, распределяются неравномерно, плавно убывая от малых значений к большим. Подобное распределение амплитуд наблюдается и при механической стимуляции. При надпороговых насыщающих интенсивностях ультразвука распределения амплитуд имеют два максимума, если длительность стимула превышает 30 мс, если же длительность стимула составляла 10 – 20 мс, то распределения амплитуд становятся симметричными с четко выраженным максимумом. Распределения длительностей, латентных периодов и длительностей передних фронтов импульсов в этой области раздражения также близки к нормальным (табл. 2.8) [5].

Между амплитудой, длительностью и длительностью переднего фронта световых импульсов первых ответов клеток на стимуляцию существует

определенное соотношение (рис. 2.14). Такие соотношения отмечены как во всей области раздражения ультразвуком, так и при механической стимуляции для одновершинных импульсов. Латентные периоды с амплитудами импульсов не коррелируют [5].

Таблица 2.8 – Средние значения характеристик биолюминесцентных импульсов (А) и их дисперсии (Б) исследованных видов динофлагеллят при параметрах стимула 2,0 Вт/см², 10 мс [5]

Вид	Амплитуда, отн. ед.		Длительность, мс		Латентный период, мс		Передний фронт, мс	
	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б
<i>Peridinium crassipes</i>	31	8,5	80	12	13,6	4	18	2,4
<i>P. depressum</i>	27	7,8	75	18	15,4	3,6	19,5	2,5
<i>P. globulus</i>	26	8,1	100	22	13,0	4	19,3	2,8
<i>P. pallidum</i>	18	5,6	105	20	14,0	2,7	21,1	2,9
<i>P. conicum</i>	16,5	6	110	—	—	—	20,8	2,8
<i>Peridinium sp.</i>	6,2	2	80	16	—	—	—	—
<i>Gonyaulax polygramma</i>	9,2	4,2	116	25	15,2	3,8	18,4	3,2
<i>Pyrophacus horologicum</i>	14,9	4,1	96	30	—	—	—	—

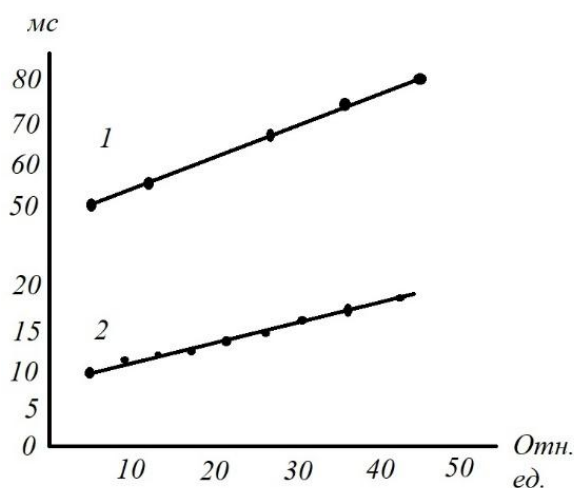


Рисунок 2.14 – Зависимость между амплитудой и длительностью (1) и амплитудой и длительностью переднего фронта (2) биолюминесцентных импульсов *Peridinium depressum* [5]

В области стимуляции ультразвуком, где распределения амплитуд близки к нормальным, средние значения характеристик импульсов, полученных от групп в 15-20 клеток одного вида, отличаются друг от друга не более чем на 20%. Это позволяет использовать небольшие выборки для исследования зависимости характера биолюминесценции от тех или иных факторов. Так, у *P. depressum*, клетки которого хорошо различимы под микроскопом по степени насыщенности пигментом, была исследована зависимость характеристик импульсов от степени пигментированности. Результаты показали, что более пигментированные клетки имеют меньшую амплитуду световых импульсов, что, вероятно, связано с частичным поглощением света собственными пигментами клетки. Средние значения амплитуд составили $16,4 \pm 5$ отн. ед. для более пигментированных клеток и $25,8 \pm 4$ отн. ед. для менее пигментированных при одинаковых значениях длительностей импульсов [5].

Для клеток вида *Pyrophacus horologicum* отмечена зависимость биолюминесценции от фазы клеточного цикла. Неподвижные, готовящиеся к делению клетки имеют меньшие значения амплитуд ($11,4 \pm 1,9$ отн. ед.), чем активно движущиеся формы ($18,1 \pm 3,5$ отн. ед.) [5].

Сопоставление распределений амплитуд биолюминесцентных импульсов, полученных в ответ на механическую и ультразвуковую стимуляцию, показывает, что использованное механическое раздражение недостаточно для возбуждения максимального биолюминесцентного ответа клеток. С другой стороны, сходство реакции клеток на оба способа стимуляции – импульсная активность и одинаковое соотношение характеристик импульсов при том и другом способах стимуляции, вероятностный характер ответов, близость латентных периодов, однотипный характер распределений амплитуд при механическом и близком к пороговому ультразвуковому раздражению –

позволяет предполагать, что механизмы ультразвукового и механического воздействия на клетку аналогичны [5].

Согласно современным представлениям о последовательности процессов, протекающих в различных механорецепторах при действии на них адекватного стимула, стимуляция ведет к деформации механореактивных структур, что, в свою очередь, вызывает изменение ионной проводимости и возникновение ионных токов. Нет оснований предполагать наличие каких-либо иных процессов, предшествующих генерации биолюминесцентного импульса при действии на клетки механического и, очевидно, ультразвукового раздражения. Эксперименты по регистрации электрической активности ночесветки *Noctiluca miliaris* при механической стимуляции биолюминесценции показали, что вспышка света следует только за потенциалом действия. Для ультразвуковой стимуляции подобные исследования не проводились, но способность ультразвуковых колебаний вызывать изменение разности потенциалов на мембранах показана для ряда клеток и одноклеточных организмов. Для клеток динофлагеллят не известны специализированные структуры, воспринимающие внешнее раздражение; вероятно, функцию механорецепции выполняет либо вся поверхность клетки, либо ее отдельные участки. Отсутствием таких структур можно объяснить длительное скрытое время реакции на стимуляцию [5].

Как показано для клеток *Noctiluca miliaris*, биолюминесцентный импульс отсутствует при медленных подпороговых изменениях мембранного потенциала, возбуждаемого механической стимуляцией. В связи с этим заслуживают внимания результаты, свидетельствующие о градуальной зависимости биолюминесцентных ответов от увеличения силы раздражения, которые наблюдались как при механической, так и электрической стимуляции. Такая же градуальная зависимость, наблюдаемая нами для некоторых исследованных видов, статистически достоверна и может быть связана с дискретностью и взаимонезависимостью механореактивных участков, существование которых предполагается, а в ряде случаев доказана для некоторых репетирующих поверхностей. Недостаточно четкая выраженность

градуальной зависимости у некоторых исследованных видов, вероятно, связана с меньшими размерами воспринимающих раздражение поверхностей и соответственно вовлечением в реакцию разного количества реактивных элементов. Кроме того, ультразвуковое и механическое раздражение не являются точечными, и, очевидно, определенное влияние на вариации величин порогов чувствительности, на разбросы латентных периодов и степень суммации импульсов оказывают форма и ориентация клеток по отношению к раздражителю [5].

Экспериментальные данные позволяют сделать вывод о том, что в области насыщающего воздействия при коротких стимулах методика ультразвукового раздражения хорошо воспроизводима, допускает многократное применение раздражения, позволяет получать стабильные характеристики биолюминесцентных импульсов и может быть использована в качестве близкой к адекватной стимуляции биолюминесценции динофлагеллят [5].

На сегодняшний день среди всех методов и средств проведения исследования биолюминесценции наиболее предпочтительным является измерение при помощи батифотометра.

Во всех существующих батифотометрах необходимым элементом батифотометра является устройство регистрирующее свечение, чаще всего используют либо электронный фотоумножитель, либо фотосенсор. Так же обязательным элементом является либо прибор для стимуляции, либо конструктивная особенность, которая оказывает раздражающее действие на планктонные организмы, в результате которого они начинают светиться.

Практически во всех батифотометрах используется механический метод стимуляции, реализованный при помощи сетки или же при помощи импеллерного насоса. Но этот метод имеет свои недостатки: при механическом раздражении клетки реагируют не на каждый поданный импульс, в добавок использование механического раздражения недостаточно для возбуждения максимального ответа светящихся организмов.

Альтернативой механическому методу возбуждения может быть ультразвуковой метод. Данные, полученные в результате экспериментов А.П. Шевырногова, В.С. Филимонова и Н.А. Тюльковой, позволяют сделать вывод о том, что в области насыщающего воздействия при коротких стимулах методика ультразвукового раздражения хорошо воспроизводима, допускает многократное применение раздражения, позволяет получать стабильные характеристики биолюминесцентных импульсов и может быть использована в качестве близкой к адекватной стимуляции биолюминесценции динофлагеллят. Кроме этого, вероятность появления ответа на ультразвуковую стимуляцию приближена к 100 %, при значении мощности ультразвука 1,2—2,0 Вт/см² и длительности более 30 мс.

3 Разработка батифотометра с ультразвуковой системой стимуляции

3.1 Выбор комплектующих для батифотометра на основе анализа существующих приборов

При проектировании батифотометра, необходимо выбрать основные конструктивные элементы и комплектующие:

- световая ловушка;
- устройство для стимуляции планктонных организмов;
- устройство для регистрации свечения;
- расходомер (также играет роль световой ловушки на выходе).

Световая ловушка. Вращающийся световой отражатель (рис. 3.1) расположен рядом с входом в камеру стимуляции и является первым, с чем сталкиваются организмы по мере их поступления. Его спиральная форма и свободное вращение предназначены для минимизации любого значительного стресса для организмов, что уменьшает рестимуляцию организмов до того, как они достигнут камеры с ультразвуковой стимуляцией [32].



Рисунок 3.1 – Вращающийся световой отражатель [32]

Вращающийся световой отражатель будет покрашен в абсолютно черную матовую светопоглощающую краску так как основная его цель – заблокировать любой внешний свет от входа в камеру обнаружения.

Стимуляция. Одной из самых главных частей батифотометра является его устройство для стимуляции биолюминесценции.

Как уже было сказано ранее, практически во всех разработанных приборах измерения биолюминесценции применяется механический вид стимуляции, который может быть реализован при помощи помещения перед измерительной камерой стимулирующей решетки, либо же использование в конструкции измерительного прибора импеллерного насоса. Но в ходе результатов экспериментов Шевырнова [26], Тюлькова и Филимоновой [5], выяснилось, что в качестве стимулирующего воздействия на планктон можно использовать ультразвуковые волны, причем в отличие от механического метода стимулирования ультразвуковой метод имеет некоторые преимущества:

- вероятность появления ответа на ультразвуковую стимуляцию приближается к 100% при значениях $1,2 - 2,0 \text{ Вт/см}^2$ и длительности более 30 мс, тогда как при механическом раздражении на первый стимул отвечает 50% исследованной группы клеток, на второй – 24 и на третий – 6% [5];
- в области насыщающего воздействия при коротких стимулах методика ультразвукового раздражения хорошо воспроизводима, допускает многократное применение раздражения, позволяет получать стабильные характеристики биолюминесцентных импульсов [5].

Так как стало понятно, что использование механического раздражения недостаточно для возбуждения максимального биолюминесцентного ответа клеток, было принято решение использовать ультразвуковой метод стимуляции свечения у планктонных организмов в разрабатываемом батифотомере. Схема системы ультразвуковой стимуляции представлена на рисунке 3.2.

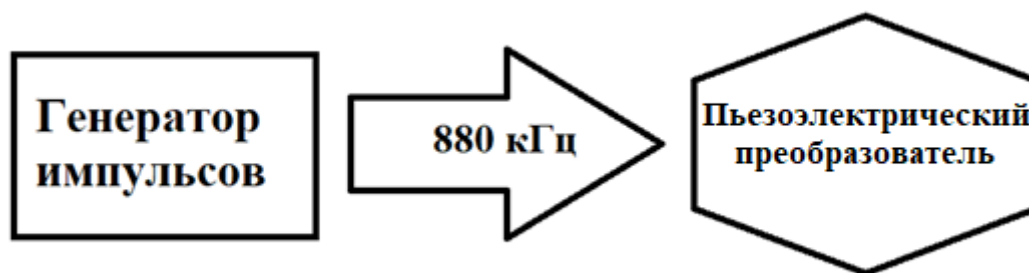


Рисунок 3.2 – Схема ультразвуковой установки

Основными элементами установки являются пьезоэлектрический преобразователь и генератор импульсов, обеспечивающий частоту их подачи до 880 кГц и мощности в импульсе порядка десятков Вт/см².

Такая установка будет формировать волны с частотой 880-900 кГц и мощностью от 1,2 до 2,0 Вт/см². Именно такие значения позволят использовать ультразвук и при этом избежать образования кавитационных процессов, вызвать у планктонных организмов максимальную светимость и при этом не повредить их [26].

Регистрация свечения. После того как как биолюминесцентные организмы получают стимулирующее воздействие они начнут светиться, чтобы зафиксировать это свечение необходима камера с регистрирующим устройством. Поглощение света внутренними стенками камеры обнаружения будет сведено к минимуму, так как будет использоваться покрытие из диоксида титана и полиуретана, что позволит достичь отражения более 95% излучения с длинами волн 430-700 нм. Свет, излучаемый организмами внутри камеры, будет регистрироваться с помощью модуля подсчета фотонов C13366-3050GD, предназначенный для обнаружения низкого уровня света и имеющий цифровой выход (рис. 3.3) [33]. Этот модуль состоит из термоэлектрически охлаждаемого много пиксельного счетчика фотонов (Multi-pixel photon counter (MPPC)), усилителя, схемы компаратора, высоковольтной схемы питания и схемы регулирования температуры. Фоточувствительная область 3 × 3 мм, а выходной сигнал цифровой. Модули работают только путем подключения их к внешнему

источнику питания (± 5 В). Основные характеристики модуля представлены в таблице 3.1.



Рисунок 3.3 – Модуль подсчета фотонов C13366-3050GD [33]

Таблица 3.1 – Основные характеристики модуля подсчета фотонов [33]

Размер фоточувствительной площади, мм	3 x 3
Шаг пикселей, мкм	50
Количество пикселей	3600
Напряжение питания, В	± 6
Диапазон рабочей температуры, °С	- 10 до + 40
Диапазон спектрального отклика, нм	320 до 900
Пиковая чувствительность, нм	450

Расходомер. Расходомер позволит производить измерения скорости потока, с какой скоростью поток с биолюминесцентными организмами проходит внутренние камеры батифотометра. Это поможет для калибровки и настройки аппарата.

В конце расходомерной трубки будет использоваться простой турбинный расходомер, используемый для определения объемного расхода. В кормовой части расходомера будет магнитоподобный бесщеточный моторный насос. Насос, подавая воду через трубку, будет выталкивать ее через коническую дивертерную пластину, радиально наружу на заднем конце.

Рабочее колесо на насосе также будет действовать как светоотражатель, при этом любой наружный свет проникает в задний конец трубки [32].

Корпус. Корпус батифотометра будет выполнен из латуни, так как этот материал обладает хорошей устойчивостью к морской коррозии, помимо этого корпус будет покрашен в черную краску на виниловой основе.

Кабели. Соединение погружного устройства батифотометра с ПК и автономным источником питания производится грузонесущим кабелем связи геофизическим морским типа КГ4-3-60 СВМ (рис. 3.4) длиной 1200 метров через разъем соединения. Герметизация кабеля в погружном устройстве осуществляется уплотнительными кольцами.



Рисунок 3.4 – Кабель связи типа КГ4-3-60 СВМ [34]

Для передачи данных с батифотометра на ПК и передачи управляющих команд с ПК на батифотометр используется кабель типа «витая пара» категории 5е (рис. 3.5). Для защиты от электрических помех при использовании высокочастотных сигналов в кабелях категорий 5е используется экранирование. Экранирование применяется как к отдельным витым парам, которые оборачиваются в алюминиевую фольгу (металлизированную

алюминием полиэтиленовую ленту), так и к кабелю в целом в виде общего экрана из фольги и/или оплётки из медной проволоки.



Рисунок 3.5 – Кабель FTP Cat.5e [35]

Система управления. Связь датчиков батифотометра с компьютером и обмен данными будет происходить посредством интерфейсного устройства, которое будет распределять управляющие сигналы с ПК на требуемые устройства и обеспечит информационный обмен между функциональными комплектующими батифотометра с ПК. Схема реализации описанной системы подключения ПК с необходимыми элементами батифотометра показана на рисунке 3.6.



Рисунок 3.6 – Схема связи ПК с компонентами батифотометра

Главное устройство управления. Представляет из себя персональный компьютер, с установленным специальным программным

обеспечением. Минимальные требования для ПК (рис. 3.7): операционная система не ниже Windows 7, частота процессор не меньше 1 ГГц, объем оперативной памяти не меньше 2 Гб, устройство хранения информации не менее 500 мб, наличие разъемов rs-232 (рис. 3.8), необходимый для подключения батифотометра к ПК, также необходимы периферийные устройства, такие как устройство вывода изображения и ввода информации.



Рисунок 3.7 – Персональный компьютер

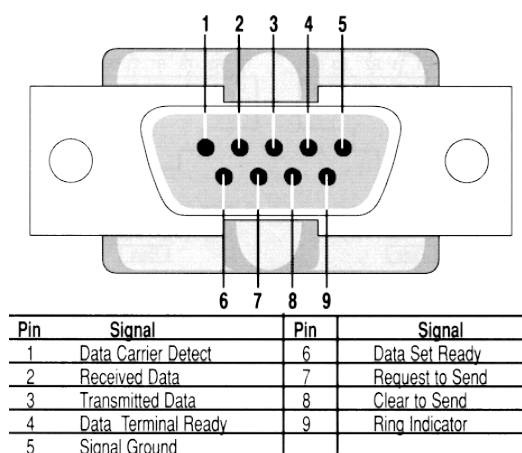


Рисунок 3.8 – Разъем RS-232 [36]

В качестве программного обеспечения, необходимого для использования батифотометра, управления и получения информации, можно использовать специализированные программы, одной из которых является программа,

разработанная под батифотометр UBAT, но позволяющая использовать и другие устройства с внесением некоторых изменений в настройках. Программа имеет интуитивно понятный интерфейс, пример интерфейса такого программного обеспечения представлен на рисунке 3.9. На главном экране будет отображаться как мощность излучения планктонных организмов, так и, в зависимости от настроек, показания длин волн, времени или показания расходомера.

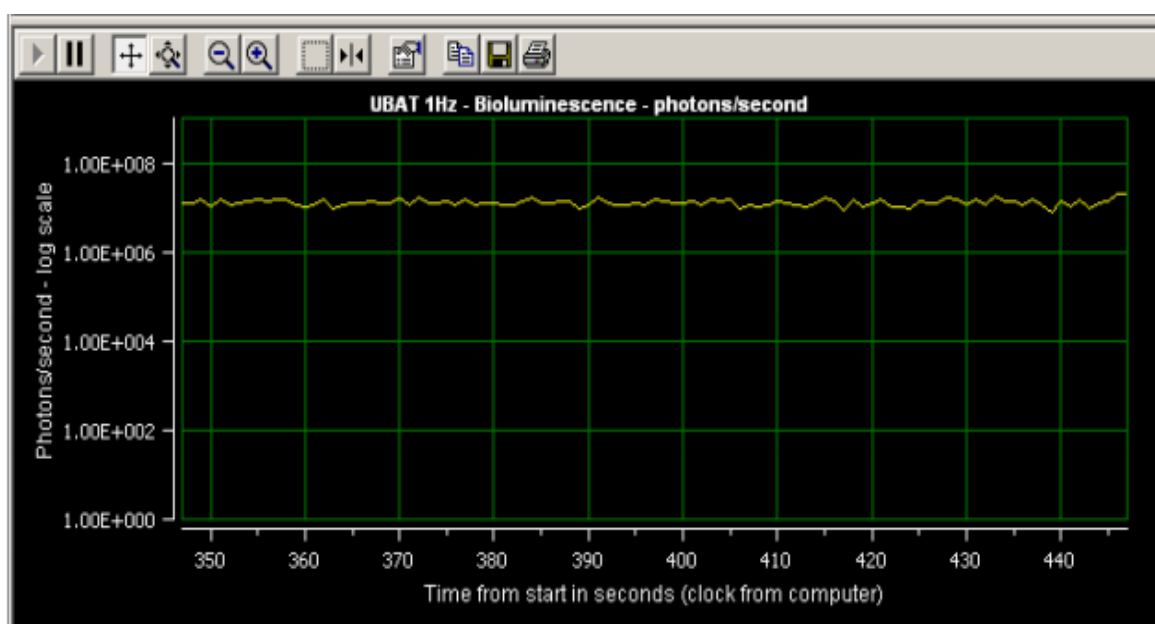


Рисунок 3.9 – Интерфейс программного обеспечения для работы с батифотометром [37]

Данное ПО позволит отслеживать процесс регистрации свечения планктонных организмов в режиме реального времени и производить запись полученных результатов в хранилище ПК.

3.2 Схема расположения комплектующих

На рисунке 3.10 изображена конструктивная схема батифотометра.

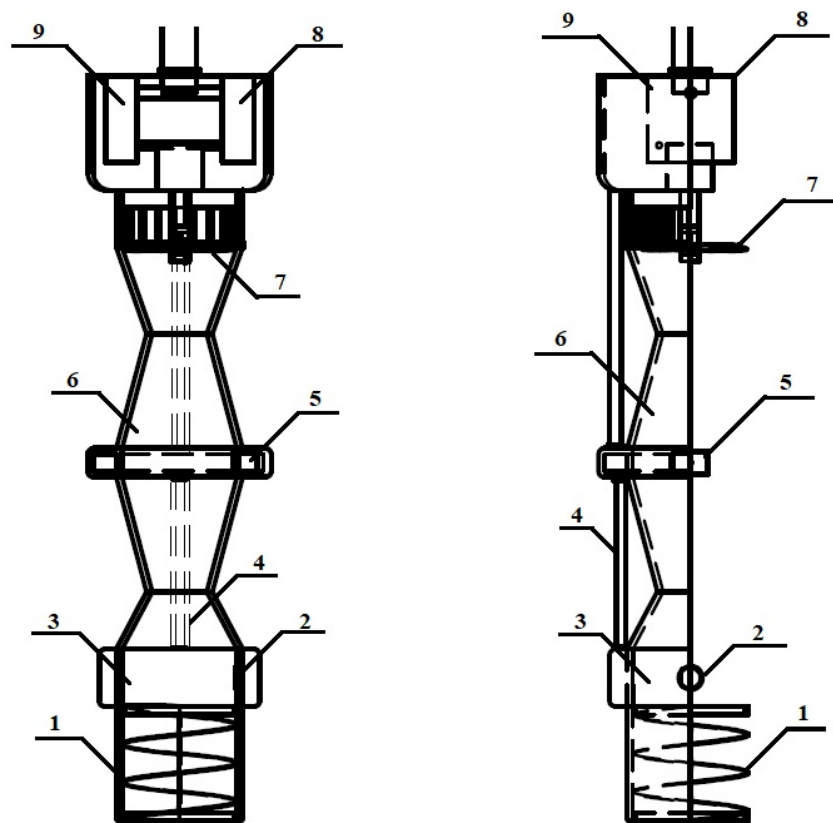


Рисунок 3.10 – Конструктивная схема батифотометра, вид спереди и слева: 1 – световая ловушка; 2 – УЗ-излучатель; 3 – камера стимуляции; 4 – проводка; 5 – счетчик фотонов; 6 – камера регистрации свечения; 7 – импеллер расходомера; 8 – генератор импульсных сигналов для УЗ; 9 – интерфейсное устройство.

Расчет объема камеры обнаружения. Измерение БПБ зависит от двух первичных факторов: резидентного времени вспышки в пределах камеры обнаружения батифотометра и времени затухания вспышки. Идеальное условие, когда $T > \tau$ и вся вспышка происходит в измерительной камере батифотометра.

В ходе проектирования батифотометра был произведен расчет зависимости резидентного времени вспышки от объема камеры обнаружения (табл. 3.2).

Параметры камеры обнаружения для таблицы 3.2 представлены на рисунке 3.11.

Таблица 3.2 – Расчет резидентного времени вспышки при разных значениях объема камеры обнаружения

$r_1, *10^{-3}$ м	30	50	70
$r_2, *10^{-3}$ м	50	75	100
$r_3, *10^{-3}$ м	30	50	70
$l_1, *10^{-3}$ м	100	200	300
$l_2, *10^{-3}$ м	50	50	150
$l_3, *10^{-3}$ м	100	200	300
Скорость потока ($v_{\text{п}}$), м/с	0,5	0,5	0,5
Объем камеры ($V_{\text{общ}}$), л	1,4	5,85	18,4
Расход ($Q_{\text{общ}}$), л/с	8,95	21,01	38,38
Резидентное время ($T_{\text{р}}$), с	0,50	0,91	1,51

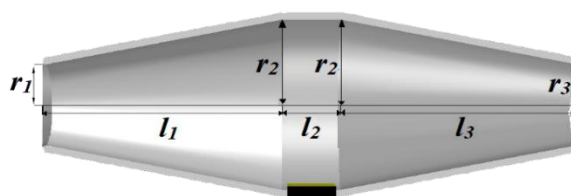


Рисунок 3.11 – Камера обнаружения

Резидентное время вспышки рассчитывалось по формуле (1)

$$T_{\text{р}} = \frac{V_{\text{общ}}}{Q_{\text{общ}}} \quad (1)$$

где $V_{\text{общ}}$ это объем камеры обнаружения, рассчитываемы по формуле (2), а $Q_{\text{общ}}$ – расход, рассчитываемый по формуле (3).

$$V_{\text{общ}} = \frac{1}{3}\pi h(r_1^2 + r_1 \cdot r_2 + r_2^2) + \pi r_2^2 + \frac{1}{3}\pi h(r_2^2 + r_2 \cdot r_3 + r_3^2) \quad (2)$$

$$Q_{\text{общ}} = \pi\left(\frac{r_1 + r_2}{2}\right)^2 v_{\text{п}} + \pi r_2^2 v_{\text{п}} + \pi\left(\frac{r_2 + r_3}{2}\right)^2 v_{\text{п}} \quad (3)$$

Полученные результаты расчетов, позволяют предположить, что для проведения качественного измерения биолюминесценции подойдет камера обнаружения с объемом 5,85 л, так как при таком объеме резидентное время вспышки составит 0,91 с, что больше длительность вспышки большинства светящихся планктонных организмов (табл. 3.3)

Таблица 3.3 – Длительность вспышки некоторых светящихся виды планктонных организмов

<i>Вид</i>	Длительность вспышки, с
<i>Gonyaulax polygramma</i>	0,15
<i>Peridinium conicum</i>	0,13
<i>Peridinium depressum</i>	0,093
<i>Peridinium Pallidum</i>	0,126
<i>Noctiluca miliaris</i>	0,25
<i>Metridia lucens</i>	0,4
<i>Metridia longa</i>	0,6

3.2 Разработка виртуальной трехмерной модели батифотометра с ультразвуковой системой стимуляции

На основании собранного теоретического материала и комплектующих была построена виртуальная трехмерная модель задуманного устройства (рис. 3.9). Данная модель была построена с помощью системы автоматизированного проектирования AutoCAD 2016. В ходе построения модели устройства были учтены габариты подобранных комплектующих. Также в ходе моделирования была сформирована камера регистрации свечения, которая имеет специфичную форму, позволяющую сконцентрировать в центре камеры максимальный пучок излучения всех планктонных организмов, попавших в камеру.

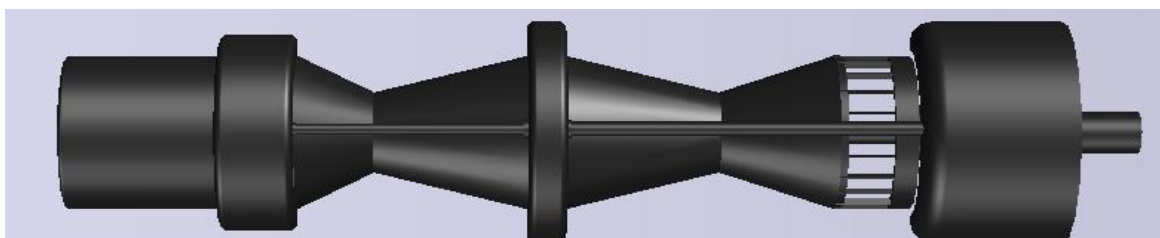


Рисунок 3.12 – Виртуальная трехмерная модель батифотометра с УЗ системой стимуляции, вид сбоку

Для более подробной демонстрации прибора, были выполнены разрезы модели (рис. 3.13), а также представлены отдельные конструктивные элементы (рис. 3.14, 3.15, 3.16). Вдобавок для наглядности, цвет элементов был изменен, в реальной модели конструктивные элементы имеют другие цвета, озвученные ранее.

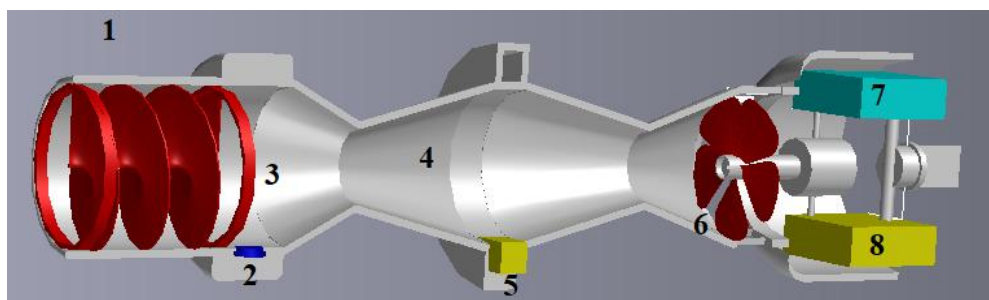


Рисунок 3.13 – Виртуальная трехмерная модель батифотометра в разрезе

На рисунке 3.13 также цифрами обозначены следующие комплектующие: 1 – светоотражательный стержень, который отдельно представлен на рисунке 3.11; 2 – ультразвуковой излучатель; 3 – камера стимуляции планктонных организмов; 4 – камера обнаружения, которая отдельно представлена на рисунке 3.12; 5 – модуль подсчета фотонов; 6 – импеллер расходомера, он же играет роль верхней ловушки, для фонового света, так же отдельно представлен на рисунке 3.13; 7 – блок интерфейсного устройства; 8 – генератор импульсных сигналов для УЗ-излучателя.

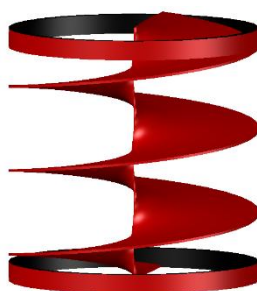


Рисунок 3.14 – Светоотражательный стержень

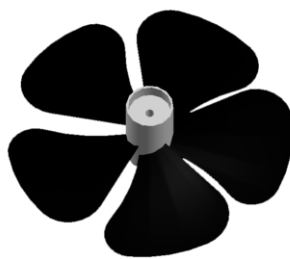


Рисунок 3.15 – Импеллерный расходомера/световая ловушка

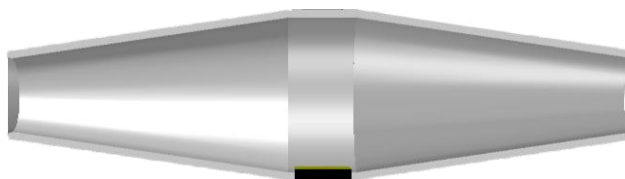


Рисунок 3.16 – Камера обнаружения

3.3 Принцип работы спроектированного батифотометра

Планктонные организмы попадают в камеру стимуляции через вращающийся световой отражатель, его спиральная форма и свободное вращение позволяют избежать любого значительного стресса для поступающих организмов, что уменьшает вероятность высвечивания организмов до того, как они достигнут камеры с ультразвуковой стимуляцией, помимо этого световой отражатель не дает проникнуть внешнему свету, и в итоге в процессе работы прибора будет регистрироваться только свет, исходящий от попавших в камеру организмов. После вращающегося светового отражателя планктонные организмы попадают в камеру стимуляции, которая необходима ввиду особенности биолюминесцентных организмов, которые не проявляют свечения без стимулирующего воздействия на них. Камера стимуляции содержит в себе ультразвуковой излучатель, состоящий из пьезоэлектрического элемента, к которому подключен генератор импульсов обеспечивающий частоту их подачи до 880 кГц и мощности в импульсе 2 Вт/см^2 , именно такие волны позволят добиться максимального излучения, при этом не повредив организмы и

избежав кавитационные процессы. После полученного стимулирующего воздействия светящиеся организмы попадают в камеру обнаружения, которая имеет минимальное поглощение света внутренними стенками камеры благодаря покрытию из диоксида титана и полиуретана, что позволит достичь отражения более 95% излучения с длинами волн 430-700 нм, а специфичная форма камеры обеспечивает максимальную концентрацию излучения в центре камеры – прямо напротив счетчика фотонов. Свет, излучаемый организмами внутри камеры, будет регистрироваться с помощью модуля подсчета фотонов C13366-3050GD, предназначенный для обнаружения низкого уровня света и имеющий цифровой выход. Затем поток воды вместе с организмами, прежде чем попасть в окружающую среду, будет проходить через импеллерный расходомер, который также играет роль световой ловушки, не пропуская фоновый свет во внутрь батифотометра.

На основании выполненного анализа комплектующих и конструктивных особенностей существующих измерителей биолюминесценции был спроектирован батифотометр с использованием ультразвуковой системы стимулирования. Основные характеристики этого прибора представлены в таблице 3.4

Таблица 3.4 – Основные характеристики проектируемого батифотометра

Вес, кг (без утяжелителя)	50
Габариты, см	длина 1300, диаметр 34
Внутренний объем, л	20
Объем камеры обнаружения, л	5,85
Электропитание, Вт	60
Глубина погружения, м	500
Источник ультразвуковых волн	Генератор импульсов и пьезокристаллический элемент
Частота ультразвуковых волн, кГц	880
Устройство регистрации свечения	Модуль подсчета фотонов C13366
Индикация результатов измерений	ПК

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биолюминесценция – важная особенность жизнедеятельности пелагического сообщества, которая может быть использована для экспресс-оценки его структурированности и функционального состояния, и поэтому это явление заслуживает внимательного изучения с точки зрения наиболее эффективного метода исследования.

В настоящей работе было проведено исследование гидробиофизических характеристик планктонных организмов, различных методов изучения биолюминесценции и методов стимулирующих воздействий на планктонные организмы с целью получения от них биолюминесцентного отклика.

В ходе исследования были получены следующие результаты. Эффективная стимуляция планктонных организмов является одним из главных факторов влияющих на качество измерений биолюминесценции планктонных сообществ *in situ* с применением оптических зондирующих устройств. В существующих батифотометрах используется система стимуляции, которая может быть улучшена, внедрением иного метода стимулирования. Таким методом является использование ультразвука в качестве стимулирующего воздействия на планктонные организмы. Была показана возможность использования и эффективность данного метода, относительно уже применяемых методов в существующих приборах для измерения биолюминесценции.

Был произведен сравнительный анализ существующих измерителей биолюминесценции для выявления необходимых комплектующих и конструктивных особенностей с целью проектирования батифотометра с ультразвуковой системой стимуляции.

На основании выполненного анализа, были выбраны необходимые комплектующие и определены конструктивные особенности, использованные при дальнейшем проектировании и создании виртуальной трёхмерной модели.

Полученные результаты исследования и макетирования могут быть применены при создании батифотометра, использующего высокоэффективный метод стимуляции биолюминесценции планктонных организмов, который позволит улучшить качество проводимых измерений биолюминесценции планктонных сообществ *in situ* с применением оптических зондирующих устройств.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Токарев Ю. Н. Основы биофизической экологии гидробионтов. Институт биолог. юж. морей им. А.О. Ковалевского, Севастополь, 2006. – 342 с.
2. Мельникова Е. Б. Биолюминесценция в функционировании экосистем пелагиали Черного моря, Киев, 2014. – С.: 21.
3. Гительзон И.И. Биолюминесценция в океане / [И.И. Гительзон, Л.А. Левин, Р.Н. Утюшев и др.]. - СПб. : Гидрометеиздат, 1992. - 282, [1] с. : ил. ; 22 см. - Библиогр.: с. 266-280 (332 назв.)
4. Бородин Д.В. стимуляция биолюминесценции морских динофлагеллят: анализ методов. «Экология моря». Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН (Севастополь). Том: 60. – 2002. – С.: 88 – 93.
5. Филимонов В.С., Тюлькова Н.А. Характеристика биолюминесцентных импульсов одиночных клеток динофлагеллят. Журнал Биология моря. - №3, Владивосток: Наука, 1981. – С.: 43-50.
6. Лямина Н.В., Лямин А.Г. Измерение биолюминесцентного потенциала *in situ*. Журнал Актуальные вопросы биологической физики и химии, - Том:2, - №1, Севастопольский государственный университет. – 2017, С:105-109.
7. О. А. Черепанов, Л. А. Левин 2, Р. Н. Утюшев. Связь биолюминесценции с биомассой и численностью светящегося и всего планктона. 1. Баренцево и норвежское моря. Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского, Севастополь, и Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук, Красноярск. – 2007, С:55-65.
8. О. А. Черепанов, Л. А. Левин 2, Р. Н. Утюшев. Связь биолюминесценции с биомассой и численностью светящегося и всего планктона. 2. Черное море. Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского, Севастополь, и Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук, Красноярск. – 2007, С:84-89.

9. Phyto`pedia: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.eoas.ubc.ca/research/phytoplankton/dinoflagellates/ceratium/c_furca.jpg – *Ceratium furca*. – (Дата обращения: 30.03.2018).
10. Datuopinion: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.sms.si.edu/irlspec/images/Gonyaulax_Lg.jpg – *Gonyaulacales polygramma*. – (Дата обращения: 30.03.2018).
11. Smhi: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.smhi.se/oceanografi/oce_info_data/plankton_checklist/dinoflagellates/protoperidinium_brevipes.gif – *Protoperidinium brevipes*. – (Дата обращения: 30.03.2018).
12. Smithsonian Environmental Research Center : [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://serc.si.edu/labs/phytoplankton/guide/dinoflagellates/protopell.jpg> – *Peridinium Pellicidum*. – (Дата обращения: 30.03.2018).
13. Copepodia: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.st.nmfs.noaa.gov/nauplius/media/copepedia/taxa/T2000097/photos/T2000097-001__cpi901-0000__Bacteriosira-fragilis.jpg – *Bacteriosira fragilis*. – (Дата обращения: 30.03.2018).
14. Science photo library: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.sciencephoto.com/media/797942/view/biddulphia-aurita-sem.jpg> – *Biddulphia aurita*. – (Дата обращения: 30.03.2018).
15. Zimnes: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://192.171.193.133/images/wb_257.jpg. – *Metridia lucens* – (Дата обращения: 30.03.2018).
16. Cenus of marine life: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.arcodiv.org/watercolumn/copepod/images/Metridia_longa/Metridia_1onga_400x400.jpg – *Metridia longa*. – (Дата обращения: 30.03.2018).
17. Scripps Institution of Oceanogrphy: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://scripps.ucsd.edu/zooplanktonguide/sites/default/files/Oithona_similis_F_tumbnail_300x300.jpg – *Oithona similis*. – (Дата обращения: 30.03.2018).

18. Crustaceans: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.seawater.no/fauna/arthropoda/images/CRW_9193.jpg – Euphausiacea sp. – (Дата обращения: 30.03.2018).
19. Genus of marine life: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.arcodiv.org/watercolumn/pteropod/Limacina_retroversa_750x750.jpg – Limacina retroversa. - (Дата обращения: 30.03.2018).
20. Genus of marine life: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.arcodiv.org/watercolumn/euphausiid/images/Thysanoessa_inermis/Thysanoessa_inermis-750x750.jpg - Thysanoessa inermis. - (Дата обращения: 30.03.2018).
21. Phyto`pedia: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.eoas.ubc.ca/research/phytoplankton/dinoflagellates/ceratium/images/small/C_fusus_horns_40xDIC_ann.jpg - Ceratium Fusus. - (Дата обращения: 30.03.2018).
22. Encyclopedia britannica: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://cdn.britannica.com/700x450/93/184793-004-11DAC31B.jpg> - Ceratium tripos. - (Дата обращения: 30.03.2018).
23. Microbiology society: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.microbiologysociety.org/uploads/assets/derivatives/650x460_highes_tperformance_/7acc3400-71dd-456b-bdfcc0f7438bf85b.jpg - Noctiluca miliaris. - (Дата обращения: 30.03.2018).
24. Гительзон И.И. Живой свет океана, Москва: Наука – 1973. – 126 с.
25. Филимонов В.С., Садовская Г.М. Билюминесценция гетерогенных популяций светящихся видов фитопланктона при ультразвуковой стимуляции. Журнал Биология моря. - №2, Владивосток: Наука, 1982. – С.: 51-70.
26. Шевырногов А.П. Характеристики билюминесцентных импульсов *Metridia Pacifica* при стимуляции ультразвуком. В кн.: Сверхслабые свечения в биологии: Тез.докл., М., 1972, с.124-126.

27. Herren C.M., Haddock S.H.D., Johnson C., Orrico C.M., Moline M.A., Case J.F. A multi-platform bathyphotometer for fine-scale, coastal bioluminescence research. *Limnol Oceanogr Methods*, 2005, vol. 3, pp. 247-262.
28. Orrico C.M., Moline M.A., Robbins I., Zelenke B., Barnard A.H., Strubhar W., Koegler J., Moore C. A new tool for monitoring ecosystem dynamics incoastal environments: Long-term use and servicing requirements of the commercial Underwater Bioluminescence Assessment Tool (U-BAT). *Oceans 2009. MTS/IEEE*, 1-7, 2010
29. Kim G., Lee Y.-W., Joung D.-J., Kim K.-R., Kim K. Real-time monitoring of nutrient concentrations and red tide outbreaks in the southern sea of Korea. *Geophys Res Lett*, 2006, vol. 33.
30. Chelsea Technologies Group Ltd: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.chelsea.co.uk/products/marine-science/sensors/glowtracka-bathyphotometer#specification> – GlowTracka Bathyphotometer specification. – (Дата обращения: 03.06.2018).
31. Hydrooptics ltd.: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://ecodevice.com.ua/wp-content/manuals/salpa-manual.pdf> – Гидро-биофизический комплекс «Сальпа-М». – (Дата обращения: 02.06.2018).
32. A. Widder, Charles L. Frey, Lawrence J. Borne. HIDEX Generation II: A New and Improved Instrument for Measuring Marine Bioluminescence, Edith Harbor Branch Oceanographic Institution, 2003.
33. Hamamatsu: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.hamamatsu.com/resources/pdf/etd/H5783.pdf> – Photosensor modules H5783 Series. – (Дата обращения: 29.05.2018).
34. Кабель.рф: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://cable.ru/cable/marka-kg_4x35_0_66.jpg – Кабель типа КГ4-3-60 СВМ. – (Дата обращения: 23.04.2018).
35. ССК: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://svstk.ru/files/products/121203-00067.800x600.jpg> – Кабель FTP Cat.5e. – (Дата обращения: 23.04.2018).

36. AGG software: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.aggsoft.ru/rs232-pinout-cable/images/9-pinout.gif> – Разъем RS-232 – (Дата обращения: 23.04.2018).
37. Host Software for UBAT: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.seabird.com/sites/default/files/documents/manual-ubat-software.pdf> – User's Guide. – (Дата обращения: 30.05.2018).