

О. А. РЫЛЬКОВА, И. Г. ПОЛИКАРПОВ, М. А. САБУРОВА

ОЦЕНКА СОПОСТАВИМОСТИ ДВУХ МЕТОДОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО УЧЕТА МОРСКОГО ГЕТЕРОТРОФНОГО БАКТЕРИОПЛАНКТОНА

Проведены сравнительные исследования общей численности бактерий (ОЧБ) различными методами. В качестве красителей для окраски бактерий использовали эритрозин (Э) и флуорохромы (Ф). Установлено, что использование больших массивов данных при сравнении усредненных по выборке показателей позволяет напрямую сопоставлять величины ОЧБ, полученные разными методами. При сравнении выборок меньшего размера ($n < 80$) по отдельным районам или сезонам года возможно введение переходного коэффициента ($K = \text{ОЧБ}_Э / \text{ОЧБ}_Ф$); экстраполяция таких «локальных» коэффициентов на большие акватории некорректна.

К настоящему времени накоплен огромный материал по количественным характеристикам (численности, биомассе, распределению) морского гетеротрофного бактериопланктона. Значительная часть этого материала получена отечественными исследователями, использовавшими в качестве красителя для микроорганизмов эритрозин [3, 4, 6, 11]. Однако, с семидесятых годов XX века для окраски микропланктона стали активно использовать флуорохромные красители, которые имеют ряд преимуществ [16, 17, 18]. Имеющиеся немногочисленные сравнительные исследования не позволяют сделать каких-либо определенных выводов о сопоставимости этих методов, однако, получаемые величины численности бактерий находятся в пределах одних и тех же порядков [2, 14].

Целью данной работы явилось проведение интеркалибрации двух методов определения количественных показателей бактериопланктона и получение переходного коэффициента для сравнения данных, полученных различными исследователями.

Материал и методы. Для анализа использовали пробы, собранные нами в различных районах Черного моря: в 37 рейсе НИС «Профессор Водяницкий» (июль 1992 г., глубоководная часть с/в части Черного моря, 21 проба); в 43 рейсе НИС «Профессор Водяницкий» (сентябрь 1993 г., шельфовая зона и свал глубин с/з части Черного моря, центр западной халистазы, 30 проб); в эстуарии р. Черной (апрель 1994 г., 10 проб); в Севастопольской бухте (февраль-март 1998 г., 12 проб); во 2 рейсе НИС «Горизонт» (июнь 1998 г., шельфовая зона Крыма, 8 проб); в 11 рейсе НИС «Диорит» (декабрь 1998 г., шельфовая зона в районе о. Змеиный, 20 проб); в 53 рейсе НИС «Профессор Водяницкий» (март-апрель 1999 г., шельфовая зона Крыма, свал глубин в районе Карадага, глубоководная часть в районе Ялты, 39 проб). Всего обработано 140 проб.

Для сопоставления величин ОЧБ каждую пробу обрабатывали параллельно, используя в качестве красителя эритрозин и флуорохромы (профлавин или акридин оранжевый (АО)). Объемы фильтруемых проб для обеих методик были одинаковыми и составляли от 2 мл в летне-осенний период до 10 мл – зимой. Для сгущения проб пользовались фильтрами с идентичными характеристиками: диаметр пор 0.2 мкм, диаметр фильтрующей поверхности 25 мм. Для концентрирования бактерий использовали многоканальную фильтровальную установку («Sartorius», Германия, 25 мм). Разрежение в процессе фильтрации не превышало 150 мм рт. ст. Для равномерного распределения клеток фильтр помещали на влажную подложку из обеззоленного бумажного фильтра с диаметром пор 1.0-2.5 мкм. Основные этапы методик и использовавшиеся расходные материалы представлены в табл.1. Все реактивы для окраски и фиксации микроорганизмов перед каждым исследованием предварительно фильтровались с помощью стерильных пластиковых шприцев с фильтром-насадкой («Sartorius», Германия, диаметр пор 0.2 мкм) для удаления неорганических частиц и микроорганизмов, попавших в растворы при их приготовлении и хранении.

На каждом фильтре просчитывали 10 - 20 полей зрения (в зависимости от плотности бактериальной популяции) для получения данных с ошибкой не более 20% при 95% уровне значимости [5].

При проведении сравнительных методических исследований обязательным условием является соблюдение идентичности процедуры на всех этапах отбора и обработки проб. В нашей работе единственное, но, на наш взгляд, весьма существенное, различие связано с использованием для концентрирования бактерий различных типов фильтров. Как видно из табл.1, при окраске эритрозином используются нитроцеллюлозные фильтры, в то время как методика окраски флуорохромами предполагает использование ядерных фильтров.

Таблица 1. Методические аспекты подготовки микробных проб для прямого счета
Table 1. Methodological aspects of treatment microbial samples for direct count

Оборудование и этапы работы	Окраска эритрозином*	Окраска флуорохромом
Тип фильтра	Нитроцеллюлозные фильтры, («Sartorius», Германия)	Ядерные лавсановые фильтры (ОИЯИ, г.Дубна, Россия)
1 этап	Фильтрация пробы (150 мм рт. ст.)	Фиксация пробы в воронке 10% глютаральдегидом (нейтрализованным морской водой) до конечной концентрации 1-2.5% (в зависимости от длительности хранения), время фиксации - 2 минуты
2 этап	Фиксация бактерий, осевших на фильтре, в парах 40% формальдегида (в чашке Петри, не менее суток)	Окраска (непосредственно в воронке) 0.33% раствором профлавина или 0.1% раствором АО. до конечной концентрации 0.033% или 0,01%, соответственно. Время окраски – 2-3 минуты
3 этап	Окраска 5% раствором эритрозина в 5% карболовой кислоте (2 часа). Отмывка излишков краски, подготовка препаратов для световой микроскопии	Фильтрация (150 мм рт. ст.), подготовка препаратов для эпифлуоресцентной микроскопии
Используемая оптика	Микроскоп «Биолам» (Ломо), Фазовый контраст, 1300 ^x	Микроскоп «Jenalumar» (Carl Zeiss, Jena), диапазон возбуждения 450-490 нм, эмиссии – 500-530 нм (для профлавина); возбуждения – 470-500 нм, эмиссии – 550-570 нм (для АО), увеличение - 1000 ^x
Источник	[9, 10]	[16, 19, 20]

*используемый метод окраски водных микроорганизмов эритрозином является широко распространенным и детально описан в отечественной литературе, поэтому нами упоминаются только основные этапы обработки проб.

Фильтры «Sartorius» (Германия) представляют собой своеобразное сито достаточной толщины (150-300 мкм), образованное полимерными пленками из нитрата целлюлозы. Порами в них служат просветы между звеньями пористого каркаса щелевидной формы. Диаметр пор, приведенный в документации, является усредненной величиной, и, к сожалению, изготовители обычно не сообщают величину стандартного отклонения. Таким образом, в различных участках фильтра диаметр пор может быть больше или меньше номинального [1]. Хотя большая часть бактериопланктона представлена клетками размером более 0.2 - 0.3 мкм, в пробах могут попадаться и более мелкие организмы (особенно в холодный период года и на глубинах), а также микоплазмы, не имеющие ригидной клеточной стенки [2, 8, 13]. Такие ультрамикрорганизмы могут «проскакивать» в фильтрат или попадать на нижние слои фильтра, толщина которого значитель-

ная. Исследователю при счете клеток приходится ориентироваться на некий средний слой фильтра, потому что организмы вне этого слоя часто не учитываются. Это может приводить к занижению численности микроорганизмов. Автофлуоресценция нитроцеллюлозных фильтров после предварительной окраски их суданом или иргаланом черным оставалась существенной. Слишком яркий фон в эпифлуоресцентном режиме не позволил использовать их в этом виде микроскопии.

Ядерные фильтры, например, «Nucleopore» (США) или производства ОИЯИ (г. Дубна, Россия), во всех отношениях являются более подходящими для оценки ОЧБ. В настоящий момент именно они рекомендованы для подсчета микроорганизмов во всех современных методических руководствах [12, 19, 20, 21]. Данные фильтры имеют четкий размер пор и небольшую толщину (10-20 мкм), что дает возможность улавливать даже ультрабактерии. Кроме того, после фильтрации все организмы остаются на верхней части фильтра и всегда учитываются микроскопистом [1]. Несомненным преимуществом этих фильтров является и то, что после предварительной окраски иргаланом черным удастся избавиться от их собственного свечения, и в эпифлуоресцентном режиме исследователь четко видит на темном фоне даже мельчайшие ярко светящиеся клетки микроорганизмов. Однако, этот тип фильтров оказался непригодным для световой микроскопии в силу их неполной прозрачности.

Таким образом, на ранних этапах обработки пробы разными методами создаются неоднородные условия, что может являться одной из причин различия данных.

В качестве флуорохромных красителей мы использовали акридин оранжевый и профлавин. Методика окраски микроорганизмов подробно представлена в табл.1. Если акридин оранжевый традиционно использовался для окраски бактерий, то профлавин (3,6-Diaminoacridine Hemisulfate) впервые был предложен для окраски простейших [16, 19]. Его использование позволяет учитывать на одном препарате как гетеротрофный, так и автотрофный компоненты микропланктонного сообщества (гетеротрофные организмы дают зеленую флуоресценцию, микроводоросли - красную, цианобактерии - ярко-оранжевую [19]). Таким образом, отпадает необходимость параллельного подсчета автотрофного пикопланктона на неокрашенных препаратах (как в случае использования АО). Хотя в прибрежных акваториях основным компонентом пикопланктонной фракции является гетеротрофный бактериопланктон, величины биомассы автотрофной составляющей могут колебаться от 0.7 до 55.2% от биомассы бактерий [2]. По сравнению с акридином оранжевым, препараты, окрашенные профлавином, имеют более контрастный, почти черный фон, что намного облегчает процесс счета клеток.

Статистический анализ проводили с использованием прикладного пакета SigmaPlot 4.0.1 (SPSS).

Результаты и обсуждение. Общая численность бактерий за весь исследованный период колебалась от 32 до $22989 \cdot 10^3$ кл/мл. Анализ всего массива данных не выявил достоверных отличий в численности бактериопланктона, полученной различными методами (рис. 1А). Наши результаты вполне согласуются в этом с данными, полученными ранее другими исследователями [7, 14, 22]. Пересчетный коэффициент ($K = \text{ОЧБ}_\text{э} / \text{ОЧБ}_\text{ф}$) колебался в широких пределах (0.17-9.86), однако, для всей выборки ($n=140$) в среднем он составил 1.38 ± 0.13 (рис. 1Б). Близкие к 1 значения K свидетельствуют о том, что при рассмотрении достаточно больших массивов данных (для сравнения усредненных значений плотностей бактериальных популяций) можно говорить о реальной сопоставимости различных методов оценки ОЧБ. Анализ случайных выборок разного размера из общего массива данных показал, что K устойчиво достоверно близок к 1 при $n > 80$ (рис. 2). Таким образом, сравнительный анализ больших выборок данных, полученных разными методами, возможен без введения поправочного коэффициента.

Использование двух разных флуоресцентных красителей – акридина оранжевого и профлавина – для сопоставления с эритрозиновым счетом позволило нам более детально оценить различия результатов, полученных разными методами. На рис. 3 приведены результаты параллельного счета ОЧБ с использованием эритрозина и акридина (рис. 3А), а также эритрозина и профлавина (рис. 3Б). В целом, тенденция, наблюдаемая при анализе всей выборки (рис. 1), сохраняется: численность бактерий, подсчитанная в

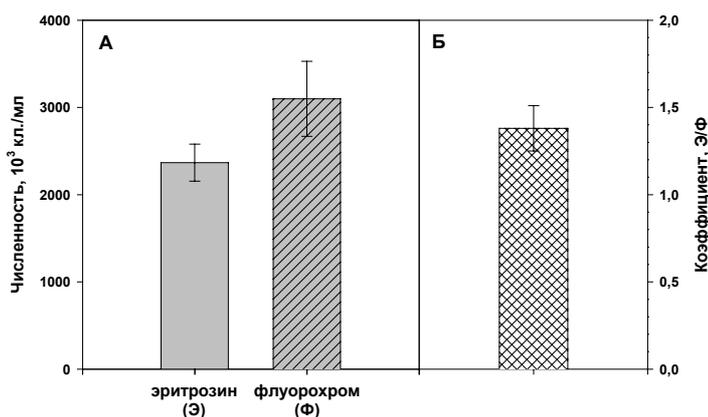


Рисунок 1. Общая численность бактерий ($N_{ср.} \pm E$), оцененная с помощью эритрозинового и флуорохромного методов (А) и их соотношение (Б). $N_{ср.}$, $K_{ср.}$ – средние значения по выборке, E – стандартная ошибка, $n=140$

Figure 1. The total bacterial number ($N_{mean} \pm E$) estimated by erythrosin and fluorochrome technics (A) and ratio between ones (B). N_{mean} , K_{mean} – mean values, E – standard error, $n=140$

акридина, заметно превышают величины ОЧБ после окраски эритрозином (рис. 3А). При этом, соотношение между параллельными данными эритрозинового и акридинового счета, в отличие от профламина, сильно варьируют от пробы к пробе. Именно на долю АО приходится большинство экстремально высоких и низких значений ОЧБ, что отражается на среднем показателе K для этой пары. Недостоверные отличия в оценке численности бактерий при окраске эритрозином и профлавином, а также близкий к 1 коэффициент пересчета ($K_{ср.} = 0.94 \pm 0.08$) позволяют нам говорить о полной сопоставимости этих методов. Различия в результатах использования акридина и профламина, по нашему мнению, связаны с разной степенью избирательности окрашивания микрообъектов этими красителями [16, 19].

Рисунок 2. Зависимость пересчетного коэффициента $K_{ср.}$ от размера выборки

Figure 2. Dependence between K_{mean} values and number of replications

Более детальный анализ данных, сгруппированных по времени или району отбора проб, выявил, что в ряде случаев разница в численности бактерий, полученная разными методами, может существенно отличаться от усредненных по общей выборке показателей.

В зимний и весенний периоды наблюдались наименьшие различия средних величин ОЧБ, полученных разными методами (рис. 4). По-видимому, низкое содержание взвеси в пробах, характерное для этого периода, облегчает эритрозиновый счет и приближает его точность к флуорохромному методу. В летне-осенний период, напротив, отличия в величинах ОЧБ при использовании разных красителей были максимальны, причем, летом результаты эритрозинового счета достоверно превышали флуорохромный, а осенью наблюдалась обратная картина. Возможно, летом на точность эритрозинового счета сильно влияет повышенное содержание в воде взвешенного органического вещества. Для объяснения же осеннего резкого превышения результатов флуорохромного счета необходимы дополнительные исследования.

Таблица 2. Различия переходных коэффициентов ($K_{cp} \pm E$) в зависимости от района отбора проб, n – количество проб
Table 2. Differences of the ratio coefficients ($K_{mean} \pm E$) in depending of sampling place, n – number of samples

Район	$K_{cp} \pm E$ (min-max)	n
Севастопольская бухта и побережье	1.92 ± 0.23 (0.84-5.16)	22
Шельф, свал глубин, глубоководье с/в части Черного моря	0.86 ± 0.08 (0.21-2.76)	50
Шельф, свал глубин, глубоководье с/в части Черного моря	0.58 ± 0.04 (0.17-1.37)	47

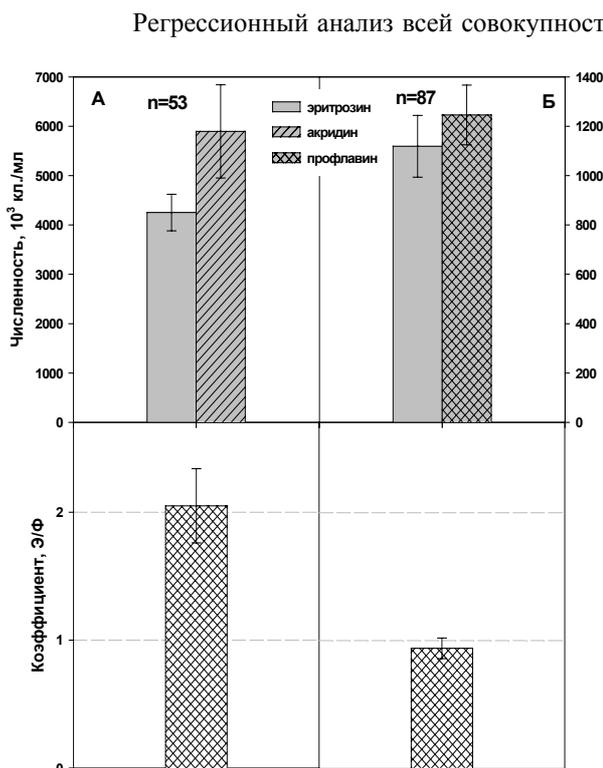


Рисунок 3. Различия в оценке общей численности бактерий ($N_{cp} \pm E$) и пересчетных коэффициентов при использовании разных флуорохромных красителей: акридина оранжевого (А) и профлавина (Б)
Figure 3. Differences between the total bacterial numbers ($N_{mean} \pm E$) and ratio coefficients ($K_{mean} \pm E$) estimated by different fluorochromes: acridine orange (A) and proflavine (B)

ром 0.2-2.0 мкм сопоставимо, а иногда и превышает количество бактериальных клеток. Учет бактерий в таких пробах методом Разумова крайне затруднен, а полученные величины могут быть завышены [2].

Заключение. Приоритетность использования различных флуорохромных красителей и эпифлуоресцентной микроскопии при оценке обилия бактериопланктона очевидна, однако, сопоставление таких результатов с многочисленными данными, полученными с помощью светового микроскопа и окраски микроорганизмов эритрозином

С 80-х годов XX века по обилию бактериопланктона Севастопольская бухта представляет собой эвтрофный водоем [15]. По-видимому, многие бактериальные клетки в акватории бухты нежизнеспособны, но они учитываются при окраске эритрозином как живые. Кроме того, прибрежные акватории, а особенно бухты, сильно подвержены штормовым явлениям, в силу чего в пробах обнаруживается значительное количество взвеси. Количество детритных частиц разме-

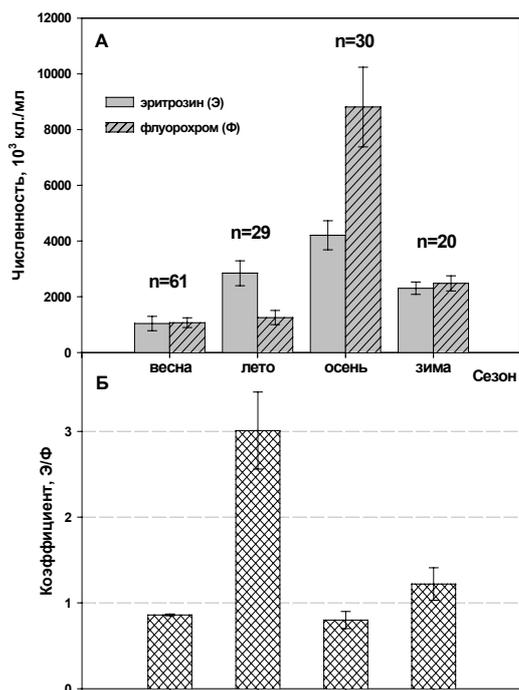


Рисунок 4. Общая численность бактерий ($N_{cp. \pm E}$), оцененная с помощью эритрозинового и флуорохромного методов в разные сезоны (А) и соотношение результатов счета (Б)

Figure 4. The total bacterial number ($N_{mean \pm E}$) estimated by erythritine and fluorochrome methods (А) and ratio between ones (В)

представляет определенную проблему. Также следует принять во внимание, что при использовании эритрозина приготовление, транспортировка и хранение препаратов не представляет затруднений (в случае необходимости, препараты могут храниться годами без ущерба для их качества). При окраске бактерий флуорохромом существует необходимость обработки препарата в течение нескольких дней, что сужает границы применения метода, а для длительного хранения необходима глубокая заморозка препаратов, требующая специального оборудования.

В соответствии с полученными нами результатами, сопоставление величин обилия бактериопланктона, полученных с использованием метода Разумова и эпифлуоресцентной микроскопии, вполне допустимо, но с определенными оговорками. Использование больших массивов данных при сравнении усредненных по выборке показателей и использование в качестве флуорохрома профлавина позволяет напрямую сопоставлять величины ОЧБ без введения пересчетных коэффициентов. При сопоставлении выборки меньшего размера ($n < 80$) по отдельным районам или временным периодам возможно введение пересчетного коэффициента на основании анализа зависимости величин ОЧБ, полученных разными методами. Экстраполяция таких «локальных» коэффициентов на большие акватории, по нашему мнению, некорректна.

Авторы выражают глубокую благодарность Г. В. Шумаковой и О. Г. Найдановой за помощь в обработке проб и анализе полученных результатов.

1. Брок Т. Мембранная фильтрация. - М.: Мир, 1987. - 464 с.
2. Копылов А. И., Сорокин П. Ю. К оценке концентрации бактериопланктона в прибрежных водах Черного моря // Микробиология. - 1988. - 57, № 5. - С. 890 - 892.
3. Крисс А. Е. Микробиологическая океанография. - М.: Наука, 1976. - 269 с.
4. Лебедева М. Н. Эколого-физиологическая характеристика бактериального населения южных морей // Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. - М., 1976. - 48 с.

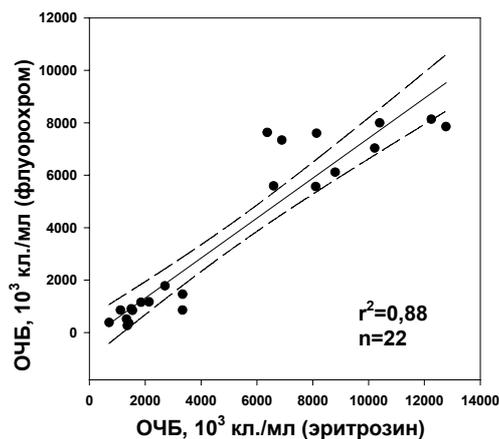


Рисунок 5. Зависимость между величинами общей численности бактерий, полученными разными методами в Севастопольской бухте и прибрежье

Figure 5. Dependence between the total bacterial number values estimated by different methods in Sevastopol Bay and coastal region

представляет определенную проблему. Также следует принять во внимание, что при использовании эритрозина приготовление, транспортировка и хранение препаратов не представляет затруднений (в случае необходимости, препараты могут храниться годами без ущерба для их качества). При окраске бактерий флуорохромом существует необходимость обработки препарата в течение нескольких дней, что сужает границы применения метода, а для длительного хранения необходима глубокая заморозка препаратов, требующая специального оборудования.

5. Лебедева М. Н., Шумакова Г. В. К вопросу о достоверности данных, полученных методом прямого учета бактерий на фильтрах // Микробиология. - 1969. - **38**, № 2. - С. 351 - 357.
6. Мицкевич И. Н., Мишустина И. Е. Развитие исследований по морской и океанической микробиологии в Академии наук СССР // Микробиология. - 1974. - **43**, № 3. - С. 564 - 571.
7. Мицкевич И. Н., Сажин А. Ф. Сравнительные определения численности бактериопланктона методом Разумова и с помощью эпифлуоресцентной микроскопии / Структура и продукционные характеристики планктонных сообществ Черного моря. - М.: Наука, 1989. - С. 117 - 122.
8. Мишустина И. Е., Батурина М. В. Ультрамикрорганизмы и органическое вещество океана. М.: Наука, 1984. - 95 с.
9. Разумов А. С. Прямой метод учета бактерий в воде // Микробиология. - 1932. - **1**, № 2. - С. 131 - 146.
10. Родина А. Г. Методы водной микробиологии (практическое руководство). - М.: Наука, 1965, - 364 с.
11. Сорокин Ю. А. Вертикальное распределение жизни в океане. Бактериопланктон / Океанология. Биология океана. Т. 1. Биологическая структура океана. - М.: Наука, 1977. - С. 124 - 132
12. Харламенко В. И. Определение численности и биомассы водных бактерий эпифлуоресцентным методом с использованием отечественных ядерных фильтров // Микробиология. - 1984. - **53**, № 1. - С. 165 - 166.
13. Чепурнова Э. А., Шумакова Г. В., Бучакчийская А. Н. Размерная структура морского бактериопланктона по результатам измерения клеток на мембранных ультрафильтрах «Сынпор – 6» и «Сынпор – 7» // Микробиология. - 1988. - **57**, вып. 1. - С. 146 - 151.
14. Чепурнова Э. А., Шумакова Г. В., Гутвейб Л. Г. Бактериопланктон / Под ред. А. В. Ковалева, З. З. Финенко, Н. А. Островской и др. / Планктон Черного моря. - Киев: Наук. думка, 1993. - С. 110 - 142.
15. Шумакова Г. В. Сезонная динамика общей численности бактерий, биомассы и продукции бактериопланктона в Севастопольской бухте // Экология моря. - 1980. - № 1. - С. 28 - 33.
16. Daley R. J., Hobbie J. E. Direct counts of aquatic bacteria by a modified epifluorescence technique // Limnol. Oceanogr. - 1975. - **20**. - P. 875.
17. Davis P. G., Sieburth J. McN. Differentiation of phototrophic and heterotrophic nanoplankton population in marine waters by epifluorescence microscopy // Ann. Inst. Oceanogr. - 1982. - **58**. - P. 249.
18. Francisco D. E., Mah R. A., Rabin A. C. Acridine orange epifluorescence technique for counting bacteria // Trans. Am. Microsc. Soc. - 1973. - **92**. - P. 416.
19. Haas L. W. Improved epifluorescence microscopy to planktonic micro-organisms // Ann. Inst. Oceanogr. - 1982. - **58**. - P. 261
20. Hobbie, J. E., Daley, R. J., Jasper, S. Use of Nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy // Applied and Environmental Microbiology. - 1977. - **33**. - P. 1296 - 1307.
21. Turley C. M. Direct estimates of bacterial numbers in seawater samples without incurring cell due to sample storage / Paul F. Kemp et al. // Handbook of methods in aquatic microbial ecology. - Lewis Publishers, 1993. - P. 143 - 147.
22. Van Es F. B., Meyer-Reil L. A. Biomass and metabolic activity of heterotrophic marine bacteria // Adv. Microbiol. Ecol. - New York, London: Plenum Press. - 1982. - **6**. - P. 111 - 170.

Институт биологии южных морей НАН Украины,
г. Севастополь

Получено 23.06.2003

O. A. RYLKOVA, I. G. POLIKARPOV, M. A. SABUROVA

COMPARISON BETWEEN FLUORESCENCE AND ABSORPTION STAIN METHODS FOR QUANTITATIVE DIRECT COUNT OF THE MARINE HETEROTROPHIC BACTERIA

Summary

Comparative studies of total bacteria number (TBN) using different methods have been carried out. Erythrozin (E), fluorescent dyes (F) were used. We have determined that comparison of selection-averaged indices using large datasets it is possible to compare values of TBN directly without using the coefficients ($K = TBN_E / TBN_F$). While comparing smaller selections ($n < 80$) from different regions or time periods using of conversion coefficients is possible. Extrapolation of such "local" coefficients on large water areas is incorrect.