

ISSN 0203-4646

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ ИМ. А. О. КОВАЛЕВСКОГО

ЭКОЛОГИЯ МОРЯ

1871



37

1991

УДК 591.524.12:573.3 (26) (083.131)

Б. Г. АЛЕКСАНДРОВ, О. А. АБЛОВ

МЕТОДИКА ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО УЧЕТА ЖИВЫХ И МЕРТВЫХ ОРГАНИЗМОВ МОРСКОГО ЗООПЛАНКТОНА С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

На основе критического анализа существующих методов дифференцированного учета живых и мертвых организмов показана необходимость их совершенствования для морского зоопланктона. Предлагается решение этой задачи с помощью флуоресцентной микроскопии (краситель: акридиновый оранжевый). Описанная методика позволяет дифференцировать животных различных систематических групп уже через 15 мин после окрашивания. Обработанные пробы остаются пригодными для анализа 3—5 недель.

Проблема изучения физиологического состояния животных и растений на клеточном и организменном уровнях имеет относительно давнюю историю. Во многих областях биологии, в частности цитологии, гистологии и физиологии, она является ключевой и потому с методической стороны решена достаточно основательно. В меньшей степени разработаны методические основы дифференцированного учета живых и мертвых организмов в гидробиологии, хотя важность данного вопроса в исследовании водных экосистем очевидна. При изучении зоопланктона учет отмерших организмов оказывается необходимым для оценки продукционных характеристик пелагиали, пространственного распределения организмов, выявления районов с различным уровнем загрязнения и др.

Особую остроту данная проблема приобретает при исследовании активных поверхностей Мирового океана, в частности нейстали [2]. Здесь, с одной стороны, проходят первые фазы эмбрионального и постэмбрионального развития большинства организмов планктона, нектона и бентоса [1], с другой — наблюдается своеобразная аккумуляция загрязняющих веществ, что может привести к изменению продуктивности океана [10]. Работами Л. М. Зелезинской [3] на примере массовых представителей копепоид и кладоцер Черного моря показано, что в составе проб сетного планктона, собранного с микрогоризонта 0—5 см, количество трупов ракообразных достигало 100% общей численности.

Обзор существующих методов. Наиболее распространенным способом оценки физиологического состояния водных беспозвоночных, а также клеток животных и растительных организмов является окрашивание красителями различной химической природы. По способности их проникновения через живые мембраны существующие способы окрашивания условно можно подразделить на две группы: витальные (прижизненные) и постмортальные (посмертные).

К первой группе относятся красители, хорошо проникающие в живые клетки и связывающиеся здесь ионными, реже ковалентными связями с различными органическими соединениями. При этом живые организмы приобретают цвет красящего вещества, а мертвые остаются неокрашенными. Наибольшее распространение среди красителей этой группы при изучении морского планктона получил нейтральный краситель [17—19] — основной анилиновый краситель, взаимодействующий с нуклеиновыми кислотами, кислыми белками и другими соединениями кислотного характера [15]. К основным недостаткам метода относится

© Б. Г. Александров, О. А. Аблов, 1991

высокая трудоемкость процесса, чрезмерная длительность окрашивания (от 1 до 6 ч) и невозможность анализа животных различных таксонов в одной пробе.

Постмортальное окрашивание осуществляется с использованием красителей, не проникающих через живые мембраны и поэтому окрашивающих лишь поврежденные либо мертвые организмы (клетки). Красящие вещества этой группы, в свою очередь, различаются по природе химического взаимодействия с органическими соединениями клеточных структур. Так, проционовые красители взаимодействуют с белками и углеводами с образованием прочной ковалентной связи, а кислые цитоплазматические красители, такие, как анилиновый голубой, взаимодействуют с веществами основного характера с образованием более слабых ионных связей. Попытки использования проционовых красителей (ярко-голубого RS и ярко-красного 5BS) при изучении морского планктона показали слабую применимость данного метода для личинок гастропод и бивальвий [4]. Более успешно в практику гидробиологических исследований вошел анилиновый голубой краситель, однако область его применения ограничена пресными водами [20]. К общим недостаткам использования постмортальных красителей следует отнести некоторое завышение показателей смертности планктона, вызванное отмиранием животных в самом красителе.

Помимо описанных способов окрашивания свежеобранного материала существует возможность дифференцированного учета живых и мертвых организмов в зафиксированных консервантом пробах независимо от сроков их хранения. Такой метод основан на применении красителей, позволяющих получить более рельефную картину отличительных изменений тканевых структур мертвых разлагающихся организмов. Для этих целей применяется 5%-ный водный раствор эритрозина [5]. Метод в одинаковой степени применим при анализе пресноводного [6] и морского [3] планктона. К существенному недостатку метода относится невозможность дифференциации недавно отмерших особей. Постмортальные изменения дифференциации становятся различимыми лишь спустя три и более часов после наступления смерти. Помимо этого, сложность выявления некротических изменений не позволяет вести быструю дифференциацию особей в массовом материале.

Применение флуоресцентных красителей с последующим анализом материала в УФ-свете в практике гидробиологических исследований остается без должного внимания. Несмотря на широкое применение данного метода в гистологии [7], флуоресцентная микроскопия в гидробиологических исследованиях применяется лишь для анализа микроорганизмов и одноклеточных водорослей [13, 21]. Попытки применения флуоресцентных красителей в исследованиях морских копепод положительных результатов не дали [18].

Цель данной работы — изучение возможностей использования флуоресцентной микроскопии с применением акридинового оранжевого для дифференцированного учета живых и мертвых организмов морского планктона.

Оборудование и материалы. Исходным материалом исследований служили сетные сборы планктона Одесского залива. Живые особи отбирались после предварительного отстаивания в 20-литровых емкостях и привлечения к поверхности с помощью направленного пучка света. Умерщвление организмов осуществлялось методом температурного шока, путем нагревания на водяной бане до 45 °C.

Окрашивание проводили, используя свежеприготовленный 1%-ный раствор акридинового оранжевого на дистиллированной воде (исходный раствор), который вводили в емкости с анализируемыми организмами для достижения той или иной рабочей концентрации.

В каждом опыте по окрашиванию манипуляции с живыми и мертвыми организмами, изолированными друг от друга в разных емкостях,

тах, осуществлялись синхронно. После завершения необходимых операций из каждой емкости отбиралось определенное число особей (не менее 10), повторная дифференциация которой осуществлялась уже при воздействии УФ-света. Результаты каждого опыта регистрировались и вычислялся процент ошибки каждого определения.

В качестве источника возбуждения флуоресценции использовали осветитель ОИ-18 с ртутно-кварцевой лампой СВД-120А.

Применение лампы СВДШ-250 повышает эффективность возбуждения люминесценции в 3—4 раза [8]. Для поглощения основной части видимого света между лампой и конденсором помещали светофильтр ФС-1. При этом лампа размещалась таким образом, чтобы свет падал непосредственно на исследуемый объект. Во избежание повреждения глаз над окулярами устанавливали желтые запирающие фильтры ЖС-3 и ЖС-18 [7, 14].

Дифференцированный учет зоопланктона проводился непосредственно в счетной камере Богорова под бинокляром МБС-1 при увеличении 2×8 . Для достижения наиболее контрастного изображения работу проводили в затемненном помещении.

Всего было проведено 113 опытов над организмами 15 видов животных из 7 классов.

Результаты исследований. Предварительные наблюдения показали, что скорость накопления красителя в организме животных различного возраста и таксономического ранга неодинакова. Наиболее интенсивное свечение живых особей под УФ-светом наблюдалось у *Acartia clausi* (в особенности у науплиусов), *Synchaeta baltica* и личинок полихет. Хуже всего окрашивались науплиусы *Balanus improvisus* II и III стадий развития, что согласуется с данными по применению других красителей [17]. В связи с этим личинки баянусов были выбраны в качестве основных опытных объектов для подбора оптимальной концентрации красителя и времени экспозиции при окрашивании.

Наилучшие результаты были получены при окрашивании животных 0,0001- и 0,0002%-ным раствором акридинового оранжевого с экспозицией 30 и 10 мин соответственно (табл. 1).

После окрашивания и фиксации 4%-ным формалином пробы помещали для хранения в холодильник, однако через 5—6 ч краситель выходил из организмов в воду и материал был уже непригоден для анализа. С целью сохранения цвета флуоресцирующего вещества, как правило, требуются буферные растворы. Несмотря на широкое применение акридинового оранжевого, в литературе нет единого мнения относительно оптимального уровня pH для проведения наилучшего окрашивания. Например, в одном случае pH предлагается поддерживать на уровне 4,0—4,2, в другом — 7,5—7,6 [9].

Для выбора подходящего буфера были поставлены дополнительные опыты. Хороший результат получен при pH=7,15. В пробах с pH=7,59 различия между живыми и мертвыми особями исчезали (табл. 2). Установлено, что при консервации окрашенной пробы нейтрализованным формалином в нее следует вносить фосфатный буфер с pH=7,3—7,5 в концентрации 1 : 9, что обеспечивает необходимую реакцию среды (pH=7,1—7,2) (табл. 3). В таких условиях стабилизирующий эффект буфера проявляется в воде с колебаниями pH от 7,5 и выше, а также при

Таблица 1. Процент ошибки при определении различий между живыми и умерщвленными личинками баянуса при различных условиях окрашивания акридиновым оранжевым

Концентрация красителя, %	Время экспозиции, мин	Число опытов	Ошибка определения, %
0,01	5	3	Нет различий
0,001	5	3	Нет различий
0,0005	5	6	$9,5\pm 3,5$
0,0005	10	10	$15,6\pm 4,0$
0,0002	10	19	$6,8\pm 2,0$
0,0002	30	10	$16,8\pm 5,4$
0,0001	10	5	$7,8\pm 3,0$
0,0001	30	5	0
0,00005	30	5	Нет различий

Таблица 2. Результаты применения различных буферов для фиксации окраски планктона в законсервированных 4%-ным раствором формалина пробах

Морская вода, мл	Буфер		pH смеси	Наблюдаемый эффект *
	Состав	Объем, мл		
50	Na_2CO_3	10 (мг)	8,53	Различий и свечения нет
50	—		7,59	Различий нет, свечение слабое
45	KH_2PO_4 (1/15 M)	1	7,15	Различия четкие, свечение яркое
	Na_2HPO_4 (1/15 M)	4		
48	CH_3COONa (1 N)	1	5,14	Различий нет, свечение слабое
	CH_3COOH (1 N)	1		

* Анализируются различия между живыми и умерщвленными особями при воздействии УФ-света.

фиксации проб формалином концентрации от 2 до 4%. Требуемый диапазон pH может быть получен и при использовании других буферных систем, например вероналовой, фосфатно-щелочной [11].

Обсуждение. Акридиновый оранжевый относится к красителям группы основных флуорохромов и находит широкое применение в гистологии и микробиологии для дифференциации живых и погибших клеток [7]. Флуорохромы вступают в реакцию с нуклеиновыми кислотами независимо от локализации последних в клетке, *in vivo* они реагируют с ядерными ДНК и РНК и проявляют слабое сродство к внеядерным нуклеиновым кислотам [12]. В практике гидробиологических исследований акридиновый оранжевый краситель применялся для изучения микроорганизмов и простейших [13, 21].

Проведенные исследования расширяют область применения данного красителя, с помощью которого удалось преодолеть многие недостатки существующих методов дифференцированного учета живых и мертвых организмов зоопланктона.

Из возможных вариантов сбора полевого материала наиболее удобным является тот, который требует наименьшего времени. Поэтому

Таблица 3. Зависимость pH, законсервированной 4%-ным раствором нейтрализованного формалина пробы, от концентрации и pH вносимого буфера (фосфатная буферная система)

pH буфера *	Концентрация буфера	
	1 : 4	1 : 9
7,12	7,20	7,05
7,30	7,36	7,16
7,48	7,38	7,20
7,50	7,46	7,26
7,60	7,50	7,44

* Соотношение солей в фосфатном буфере, необходимое для достижения требуемого уровня pH, рассчитывалось по справочным таблицам [11].

время экспозиции в буфере до 5 мин лучшей картины не дало.

Применение буфера, однако, имеет и некоторые негативные последствия: живые ночесветки, несмотря на интенсивное прокрашивание, впоследствии становятся практически неразличимыми: в пробе образу-

оптимальным следует считать окрашивание проб зоопланктона 0,0002%-ным раствором красителя при 10-минутной экспозиции.

Фиксация животных в буфере позволила улучшить качество прокрашивания организмов, снизив при этом ошибку в определении живых и мертвых особей практически до нуля и увеличив срок хранения проб, в течение которого они остаются пригодными для анализа.

Использование буфера изменяет характер окрашивания исследуемых организмов. Свечение мертвых животных всех изученных видов тусклое, равномерное или практически отсутствует. Живые особи хорошо выделяются благодаря интенсивному зеленому (реже желтоватому) свечению всего тела либо отдельных его частей. Увеличение

ется хлопьевидный осадок, который, однако, не мешает дифференциации пойманных животных.

Если проблема успешного определения живого и мертвого зоопланктона пресных вод решена [20], существующие методы аналогичных исследований в морских водоемах до последнего времени оставались неприемлемыми из-за ряда принципиальных недостатков. Наиболее разработанный метод окраски с помощью нейтрального красного [17—19] применим лишь к ограниченному числу видов морских животных. Так, при изучении меропланктона исследователь сталкивается с непреодолимыми трудностями. Для выявления живых науплиусов баянуса требуется 6-часовая экспозиция в красителе. За это же время личинки полихет и других организмов успевают перекраситься и различия между живыми и мертвыми особями исчезают.

Предложенный метод окрашивания животных акридиновым оранжевым красителем позволяет разрешить большинство трудностей и обладает достаточной простотой применения. Время подготовительных операций, предшествующих анализу, сокращается в среднем до 15 мин. Появляется возможность вести дифференцированный учет организмов различных систематических групп в одной пробе. Низкая концентрация красителя предотвращает гибель особей в процессе приготовления проб.

В окончательном виде разработанная методика осуществляется в следующем порядке: окрашивание свежесобранной пробы, 0,01 мл исходного раствора красителя (1,0% акридинового оранжевого на дистиллированной воде) на 50 мл пробы — продолжительность 10 мин; промывка в морской воде — 1 мин; фиксация в буфере (1 часть 1/15 M раствора KH_2PO_4 + 4 части 1/15 раствора Na_2HPO_4) — 2 мин; промывка в морской воде — 1 мин; перенесение пробы в консервирующий раствор (45 мл морской воды + 5 мл буфера + 5 мл 40%-ного нейтрализованного формалина); хранение проб в холодильнике — 3—5 недель.

Интенсивность накопления красителя в организме живых особей тесным образом связана с их физиологическим состоянием. В связи с этим перспективно использовать данный метод для более детальной оценки активности гидробионтов. Такая возможность может быть реализована с помощью микроспектрофлуориметра МСФ-1 [16], микрофлуориметра МЛИ-1, фотометрической насадки ФМЭЛ [14].

Предлагаемая методика позволяет вести дифференцированный учет зоопланктона в экспедиционных и стационарных условиях. Отношение численности мертвых животных к их общему количеству может служить индикатором качества среды, что приобретает особое значение при изучении последствий хозяйственной деятельности человека на морские экосистемы.

1. Зайцев Ю. П. Морская нейстонология. — Киев: Наук. думка, 1970. — 264 с.
2. Зайцев Ю. П. Контуробионты в мониторинге океана. — М.: Гидрометеониздат, 1983. — С. 25.
3. Зелезинская Л. М. К изучению естественной смертности некоторых организмов пелагиали Черного моря // Экологическая биогеография контактных зон моря. — Киев: Наук. думка, 1968. — С. 135—147.
4. Иванов В. Б. Активные красители в биологии. — М.: Наука, 1982. — 224 с.
5. Кастальская-Карзинкина М. А. Методика определения живых и отмерших компонентов планктона на фиксированном материале // Тр. лимнолог. ст. в Косине. — 1935. — 19. — С. 91—104.
6. Кастальская-Карзинкина М. А. Опыт применения метода учета живых и отмерших компонентов в изучении планктона Глубокого озера // Там же. — 1937. — 21. — С. 143—170.
7. Лилли Р. Патологическая техника и практическая гистохимия. — М.: Мир, 1969. — 645 с.
8. Мейсель М. Н., Кабанова Е. А., Левина Е. Н., Страхова В. А. О некоторых новых возможностях применения люминесцентной микроскопии в микробиологии // Изв. АН СССР. Сер. биол. — 1958. — 5. — С. 533—543.
9. Мельников И. А., Голубова Г. А. Применение гистохимических красителей для изучения состава взвешенного органического вещества // Методы исследования органического вещества в океане. — М.: Наука, 1980. — С. 206—211.

10. Михайлов В. И., Симонов А. И. Особенности загрязнения «нейстонного» слоя океанических вод. — Л.: ГО СССР, 1984. — С. 36—37.
11. Рабинович В. А., Хавин З. Я. Краткий химический справочник. — Л.: Химия, 1977. — 376 с.
12. Ричардс О. В. Флуоресцентная микроскопия // Методы цитологического анализа. — М.: — Изд-во иностр. лит., 1957. — С. 214—244.
13. Сажин А. Ф. Летний бактериопланктон в юго-западной части Тихого океана. — Куйбышев, 1986. — С. 33—35.
14. Скворцов Г. Е., Панов В. А., Поляков Н. И., Федин Л. А. Микроскопы. — Л.: Машиностроение, 1969. — 512 с.
15. Фрайсгаф Д. Т. Реактивы и препараты для микроскопии. Справочник. — М.: Химия, 1980. — 286 с.
16. Яшин В. А., Карнаухов В. Н. Микроспектральный анализ в морских биологических исследованиях // Экология моря. — 1984. — Вып. 16. — С. 65—71.
17. Crippen R. W., Perrier J. L. The use of neutral red and evans blue for live-dead determinations of marine plankton // Stain Technol. — 1974. — 49, N 2. — P. 97—104.
18. Dressel D. M., Heinle D. R., Grote M. C. Vital staining to sort dead and live copepods // Chesapeake Sci. — 1972. — 13. — P. 156—159.
19. Fleming J. M., Coughlan J. Preservation of vitally stained zooplankton for live/dead sorting // Estuaries. — 1978. — 1. — P. 135—137.
20. Seepersad B., Crippen R. W. Use of aniline blue for distinguishing between live and dead freshwater zooplankton // J. Fish. Res. Board. Can. — 1978. — 35. — P. 1363—1366.
21. Wood E. J. F. Fluorescens microscopy of marine microbiology // J. Conseil perman. intern. explorat. mer. — 1955. — 21, N 1. — P. 6—7.

Одес. филиал Ин-та биологии юж. морей
им. А. О. Ковалевского АН УССР

Получено 20.01.89

B. G. ALEKSANDROV, O. A. ABLOV
**METHODS FOR DIFFERENTIAL REGISTRATION OF DEAD
AND LIVE ORGANISMS OF MARINE ZOOPLANKTON
BY FLUORESCENT MICROSCOPY**

Summary

Critical analysis of the existing methods for differential registration of dead and live organisms has shown the necessity of their perfection for marine zooplankton. This problem is suggested to be solved by the fluorescent microscopy. The method described permits differentiating animals of different systematic groups just 15 minutes after their staining. The treated samples are appropriate for analysis within 3—5 weeks.