

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ им. А.О. КОВАЛЕВСКОГО

На правах рукописи

ЛИТВИНЮК ДАРЬЯ АНАТОЛЬЕВНА

**МОРСКОЙ ЗООПЛАНКТОН И МЕТОДИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ЕГО
ИЗУЧЕНИЯ**

Специальность

03.02.10. – Гидробиология

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Самышев Эрнест Зайнуллинович

МОСКВА 2015

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
РАЗДЕЛ 1.....	16
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. История изучения и методологические аспекты оценки смертности зоопланктона.....	16
1.2. Данные о соотношении живых и мёртвых организмов зоопланктона в разных районах Мирового океана (обзор).....	28
1.2.1. Состояние вопроса в Севастопольской бухте и побережье.	28
1.2.2. Распределение мёртвой фракции зоопланктона в Чёрном море и других районах Мирового океана.	32
1.3. Основные причины гибели морского и пресноводного зоопланктона, не связанной с выеданием хищниками (обзор литературных данных)...	37
РАЗДЕЛ 2.....	43
МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	43
2.1. Методы и районы отбора проб морского зоопланктона	43
2.2. Культура копеподы <i>Calanipeda aquaedulcis</i>	45
2.2.1. Условия культивирования <i>C. aquaedulcis</i>	45
2.2.2. Контроль соотношения живых/мёртвых в эксперименте. ...	46
2.3. Подготовка к анализу.....	48
2.4. Окраска нейтральным красным (НК).....	49
2.5. Окрашивание диацетатом флуоресцеина (ДФ).....	50
2.6. Световая и флуоресцентная микроскопия окрашенных и	

неокрашенных проб культуры <i>C. aquaeduicis</i> и морского зоопланктона	50
2.7. Визуальный метод определения мёртвых организмов в пробе	51
2.8. Оцифровка изображений организмов	52
2.8.1. Микрофотографирование организмов	52
2.8.2. Измерение цветовых характеристик организмов	52
2.9. Классификация организмов по их цветовым характеристикам	55
2.10. Алгоритм оценки ДЖО в окрашенных пробах зоопланктона	58
2.11. Схемы экспериментов	59
2.11.1. Определение ДЖО в культуре копеподы <i>C. aquaedulcis</i> после окраски НК и ДФ (Эксперимент I)	59
2.11.2. Сравнение визуального метода определения ДЖО с методами окраски красителями (Эксперимент II)	60
2.11.3. Метод сохранения окраски НК в щелочной среде (Эксперимент III)	61
2.11.4. Метод заморозки пробы, окрашенной НК, на фильтре (Эксперимент IV)	62
2.11.5. Метод заморозки организмов в жидкой пробе после окраски ДФ (Эксперимент V)	63
2.11.6. Метод заморозки организмов, окрашенных ДФ, на фильтре (Эксперимент VI)	64
2.11.7. Одновременное окрашивание культуры копепод с помощью НК и ДФ (Эксперимент VII)	64
2.11.8. Усовершенствованная процедура классификации организмов зоопланктона на живые и мёртвые после их окраски витальными красителями (Эксперимент VIII)	65
2.11.9. Соотношение живой и мёртвой компонент сообщества зоопланктона в водах с разным гидролого-гидрохимическим режимом (Эксперимент IX)	66
2.12. Статистический анализ данных и программное обеспечение	67
2.13. Количество обработанного материала	67

РАЗДЕЛ 3.....	71
НОВЫЙ МЕТОД ВИТАЛЬНОЙ ОКРАСКИ ОРГАНИЗМОВ	
ЗООПЛАНКТОНА ДИАЦЕТАТОМ ФЛУОРЕСЦЕИНА (ДФ): УСЛОВИЯ	
ОКРАСКИ И ХРАНЕНИЯ ПРОБ, СРАВНЕНИЕ С ДРУГИМИ	
КРАСИТЕЛЯМИ.....	71
3.1. Определение ДЖО в культуре копеподы <i>C. aquaedulcis</i> после	
окраски НК и ДФ (Эксперимент I).....	71
3.2. Сравнение визуального метода определения ДЖО с методами	
окраски витальными красителями (Эксперимент II).....	74
3.3. Сохранение пробы после окраски НК.....	75
3.3.1. Метод сохранения окраски в щелочной среде (Эксперимент	
III).....	75
3.3.2. Метод заморозки на фильтре (Эксперимент IV).....	79
3.4. Сохранение пробы после окраски ДФ	81
3.4.1. Метод заморозки в жидкой пробе (Эксперимент V).	81
3.4.2. Метод заморозки ДФ на фильтре (Эксперимент VI).....	83
3.5. Одновременное окрашивание культуры копепод с помощью НК и	
ДФ (Эксперимент VII)	85
РАЗДЕЛ 4.....	89
УСОВЕРШЕНСТВОВАННАЯ ПРОЦЕДУРА КЛАССИФИКАЦИИ	
ОРГАНИЗМОВ ЗООПЛАНКТОНА НА ЖИВЫЕ И МЁРТВЫЕ ПОСЛЕ ИХ	
ОКРАСКИ ВИТАЛЬНЫМИ КРАСИТЕЛЯМИ (ЭКСПЕРИМЕНТ VIII)	
	89
РАЗДЕЛ 5.....	101
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОКРАСКИ РАЗНЫХ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ГРУПП	
ЧЕРНОМОРСКОГО ЗООПЛАНКТОНА С ПОМОЩЬЮ ДФ И НК	
	101
РАЗДЕЛ 6.....	109
ДИНАМИКА ДОЛИ ЖИВЫХ СОРЕРОДА В ПЛАНКТОНЕ	
СЕВАСТОПОЛЬСКОЙ БУХТЫ И ОТКРЫТОГО ПРИБРЕЖЬЯ В 2010 –	

2011 ГГ.	109
РАЗДЕЛ 7.....	120
СООТНОШЕНИЕ ЖИВОЙ И МЁРТВОЙ КОМПОНЕНТ СООБЩЕСТВА ЗООПЛАНКТОНА В ВОДАХ С РАЗНЫМ ГИДРОЛОГО-ГИДРОХИМИЧЕСКИМ РЕЖИМОМ (ЭКСПЕРИМЕНТ IX).....	120
ВЫВОДЫ	131
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	133

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АО – акридиновый оранжевый

НК – нейтральный красный

ДФ – диацетат флуоресцеина

ДЖО – доля живых организмов

L – live, живые организмы

D – dead, мёртвые организмы

Q – questionable, спорные организмы

IRC – ImageRegionColor

FA – формальдегид

N – численность бактериопланктона

V – объем бактериальных клеток

B – биомасса бактерий

FL1 – содержание нуклеиновых кислот в клетке

N_L – численность живых организмов

N_D – численность мертвых организмов

μ – удельная скорость роста

m – естественная смертность

d – скорость разложения трупов

DMSO (ДМСО) – диметилсульфоксид

ВВЕДЕНИЕ

В работе затрагиваются методологические проблемы определения доли живых и мертвых организмов в сообществе морского зоопланктона – одного из важнейших компонентов морских экосистем. Описывая фауну и флору морей СССР, выдающийся советский океанолог Л. А. Зенкевич отводил веслоногим ракообразным роль промежуточного звена между фитопланктоном и рыбой, называя копепод «настоящими кормильцами морских рыб», которые, в свою очередь, потребляют в пищу колоссальные массы планктонных диатомей [31, *Зенкевич, 1956*]. По данным Т.С. Петипа, морские Copepoda являются одной из самых многочисленных групп мезозоопланктона, на долю которых приходится 40 - 80 % его биомассы [55, *Петипа, 1981*; 57, *Раймонт, 1988*]. При этом общее число видов пелагических копепод превосходит 2 тыс. [48, *Лебедева и др.; 1982*; 60, *Сажина, 1987*]. Столь значимые количественные показатели и видовое разнообразие позволили представителям копепод занять самые различные экологические ниши – от эстуарного ила и паразитирования в более крупных животных до свободного парения в пелагиали [55, *Петипа, 1981*].

Как подчеркивал И.А. Киселёв, «при количественном подсчёте организмов очень важно уметь отличать в консервированном материале живые организмы от мёртвых компонентов планктона» [36, *Киселёв, 1965, с. 399*]. Действительно, оценить в полной мере состояние сообщества зоопланктона, а также влияние антропогенного фактора на морские биоценозы невозможно без данных о соотношении живых и мёртвых организмов. Проблема продуктивности морей и океанов также подразумевает детальное исследование жизнеспособности популяций гидробионтов. На важность этого вопроса указывает и Л.Г. Коваль: «Дифференцированный учет зоопланктона помогает вскрывать сущность и причинную обусловленность многих процессов, протекающих в морях и океанах, особенно процесс созидания и трансформации мёртвого

органического вещества, от которого зависит биологическая продуктивность водоемов» [37, Коваль, 1984, с. 109].

Традиционными методами исследования таксономического состава и численности сообщества зоопланктона не учитывается тот факт, что на момент отбора пробы её значительная часть может быть представлена мёртвыми организмами [5, Гептнер и др., 1990; 16, Дубовская, 1987; 25, Зелезинская, 1966; 37 Коваль, 1984; 51, Павлова, Мельникова, 2011; 87, Elliott, Tang 2011; 89, Farran, 1926; 120, Terazaki, Wada, 1988; 125, Weikert, 1977; 127, Wheeler, 1967], а их вклад порой достигает 100 % [130, Tang et al., 2014] от общей численности [21, Дубовская и др., 1999]. Одновременная оценка живых/мёртвых особей в пробах не вошла в практику гидробиологических исследований, в значительной степени, из-за методологических трудностей в идентификации и количественном учёте трупов [34, Кастальская-Карзинкина, 1935; 74, Черепанов, Павлова, 2008; 101, Tang et al. 2009], так как в фиксированном материале мёртвые организмы очень похожи на живых, даже если погибли более суток назад [87, Elliott, Tang, 2011; 118, Tang et al. 2006].

По определению большого энциклопедического словаря, смертность представляет собой интенсивность процесса гибели особей в популяции и выражается числом особей, умерших или погибших за определённый период времени на некоторой территории или акватории по отношению к условному их числу (к 100 или 1000) [4, под ред. Гилярова, 1999]. По [46, Одум, 1975] смертность – понятие противоположное рождаемости, величина не постоянная, которая изменяется в зависимости от условий среды и состояния самой популяции.

Причины и механизмы смертности организмов планктона весьма разнообразны. Несмотря на значительный вклад потребления хищниками в смертность (например, у копепод она может достигать 65 – 75% от общей смертности) [102, Dunlap et al. 2013; 96, Hirst, Kiørboe, 2002], гибель по другим «естественным» причинам, т.е. не связанная с хищниками – смерть

от старости, болезней и паразитов, голодания, действия неблагоприятных физических и химических факторов природного и антропогенного происхождения [18, *Дубовская, 2009*], – имеет важное значение для понимания процессов популяционной динамики. В современной англоязычной литературе для определения такого рода естественной смертности используют термин «non-consumptive mortality», например [93, *Gries, Güde, 1999*; 118, *Tang et al. 2006*] или «non-predatory mortality/death» [102, *Dunlap et al. 2013*; 87, *Elliott, Tang, 2011*; 126, *Wetzel, 1995*].

Наряду с рождаемостью и скоростью роста, смертность относится к основным факторам, влияющим на развитие и динамику численности популяции зоопланктона [9, *Гладышев, 1996*; 84, *Dubovskaya, 2008*; 102, *Dunlap et al. 2013*]. Доля живых организмов (ДЖО) в сообществе может служить индикатором не только его функционального состояния, но и качества среды обитания и, кроме того, являться критерием оценки влияния биотических и абиотических факторов на то или иное сообщество.

При всей очевидной важности исследований смертности планктонных организмов их методологическая база остаётся слабо разработанной и основана, в первую очередь, на визуальной идентификации признаков разложения организмов, т.е. почти не изменилась со времен, когда был проявлен первый интерес к проблеме. Современные методы оценки ДЖО в планктоне предполагают применение немногочисленных красителей (по одному на морские и пресноводные экосистемы), каждый из которых далек от совершенства и накладывает значительные ограничения на точность и достоверность получаемых с его помощью результатов. Визуальная же оценка исследователем степени окрашенности организмов по-прежнему остается наиболее «уязвимым местом» современных подходов вследствие её субъективности. В связи с этим в данном исследовании предпринята попытка поиска новых, современных, более удобных и надежных витальных маркеров и совершенствования существующих методов классификации организмов на живых и мёртвых после их окраски.

Актуальность темы. Рациональное использование и сохранение биологических ресурсов Мирового океана требует глубокого понимания процессов функционирования морских экосистем и закономерностей формирования их продуктивности.

Огромное фундаментальное и прикладное значение столь весомой составной части биологической структуры океана, каковой является планктон, не вызывает сомнения. И.А. Киселёв писал о крайней привлекательности своеобразного и чрезвычайно интересного по своей морфологии, биологии, экологии, биоценотическим отношениям мира планктонных организмов, их роли в жизни водоёма, в круговороте веществ, в газовом и солевом режиме и пр. Организмы планктона являются не только продуктом окружающей их среды, но и фактором этой среды [36, Киселёв, 1969]. Кроме того, зоопланктон является важнейшим звеном водных пищевых цепей.

Одной из ключевых задач гидробиологии по-прежнему остаётся изучение функциональных характеристик морских и пресноводных сообществ современными методами обработки, анализа и интерпретации материала. В связи с ростом антропогенной нагрузки на Мировой океан реакция такой многочисленной группы организмов, как морские ракообразные, может быть показателем состояния экосистемы. Другими словами, изменения, происходящие в зоопланктонном сообществе, могут являться одним из индикаторов состояния морской среды.

Данные о количестве организмов, погибших к моменту отбора проб, с одной стороны, позволяют уточнять показатели численности и биомассы, а с другой – представляют интерес при решении разнообразных исследовательских проблем, таких как оценка (а) состояния отдельного вида, и сообщества в целом; (б) условий формирования, динамики и распределения некрозоопланктона; (в) хода сукцессии в планктоне и развития кормовой базы планктоноядных рыб; (г) загрязнения и процессов самоочищения вод; (д) масштабов элиминации зоопланктона, связанных с

естественными и антропогенными причинами; (е) многолетних трендов изменения смертности зоопланктона, а также, в целом, проблемы биологической продуктивности водоёмов [35, *Кастальская-Карзинкина, 1937*; 36, *Киселёв, 1969*; 130, *Tang et al. 2014*].

«В прямой связи с районами скопления органических остатков происходит формирование биотических взаимоотношений водных сообществ – развитие гетеротрофных организмов, детритофагов и сапрофагов в планктоне и бентосе» [38, *Коваль, 1978*]. Не связанная с хищниками смертность очень важна для изучения детритных пищевых цепей и потоков вещества и энергии в водных экосистемах [115, *Dubovskaya et al. 2003*; 130, *Tang et al. 2014*; 126, *Wetzel, 1995*].

Однако баланс численности живых и мёртвых организмов сам по себе не даёт прямой информации о скорости элиминации популяции. Во всякий момент времени этот баланс обеспечивается процессами, которые определяют численности живых и мёртвых организмов. Для первых – это размножение и все формы гибели организмов, для вторых – некоторые формы гибели (при которых не происходит быстрого разрушения/изъятия организмов, как при выедании хищниками), разложение вследствие бактериальной активности, выедание мёртвых особей хищниками (копрофагами, детритофагами) и процессы седиментации. Таким образом, величина ДЖО сама по себе не может служить индикатором загрязнения среды, а представляет лишь «срез» текущего функционального состояния сообщества или популяции.

Таким образом, изучение естественной смертности, учитывая, по словам Л.М. Зелезинской [26, *Зелезинская, 1965*], сложность и многогранность этого явления, ограничено в настоящем исследовании прямым счётом числа живых/мёртвых особей планктона, без измерения скорости осаждения мёртвых организмов с помощью седиментационной ловушки.

Цель и задачи исследований. Целью диссертационной работы являлось усовершенствование методических подходов к оценке соотношения живых и мертвых организмов в планктоне, исследование с их помощью сообщества зоопланктона морских акваторий с различным гидролого-гидрохимическим режимом вод. Поставленная цель определила следующие задачи:

- Разработать новый метод витальной окраски организмов зоопланктона диацетатом флуоресцеина и апробировать его на модельной культуре и природном сообществе копепод.
- Усовершенствовать процедуру классификации окрашенных организмов на живые и мёртвые путем оцифровки их изображений и последующего статистического анализа их цветовых характеристик.
- Оценить эффективность окраски разных таксономических групп черноморского зоопланктона с помощью диацетата флуоресцеина (ДФ) и нейтрального красного (НК).
- Исследовать сезонную динамику доли живых Copepoda в Севастопольской бухте и сопредельных водах.
- Сравнить акватории, отличающиеся гидролого-гидрохимическим режимом (воды Севастопольской бухты и прилегающей акватории) по соотношению живой и мёртвой компонент в сообществе зоопланктона, исследовать возможные причины выявленных отличий.

Методы исследования. Для отбора и обработки проб мезозоопланктона использовали стандартные методы. Данные о доле живого зоопланктона получали методом окраски свежесобранных проб витальными красителями (нейтральным красным и диацетатом флуоресцеина). Классификацию организмов на живые и мёртвые проводили по их цифровым изображениям с помощью статистических методов анализа (оригинальный, запатентованный метод). Проводили сопоставление методов окраски с визуальным методом обработки фиксированной формальдегидом пробы.

Научная новизна полученных результатов. Впервые для дифференцирования морского зоопланктона на живую и мёртвую компоненту использовали маркер ферментативной активности диацетат флуоресцеина, позволивший получить достоверные и воспроизводимые результаты. Новый для этого направления подход к обработке материалов позволил статистически доказать объективность полученных данных.

Внедрены современные репрезентативные методы окрашивания проб зоопланктона для визуальной идентификации живых и мертвых особей.

Разработаны достоверные количественные критерии распознавания живых и мертвых особей в пробах зоопланктона, окрашенных витальными красителями, которые основаны на оцифровке изображений и анализе их цветовых и яркостных характеристик (патент на изобретение № 99008, зарегистрирован в Госрестре патентов Украины 10.07.2012) [68, *Муханов, Литвинюк*].

Впервые для исследованного района были получены сравнительные данные о ДЖО в точках с различным гидрологическим и гидрохимическим режимом.

Впервые выделены таксономические группы сетного зоопланктона, окраска которых витальными маркерами – нейтральным красным (НК) и диацетатом флуоресцеина (ДФ), позволяет эффективно оценивать доли живых и мертвых организмов в их природных популяциях или сообществах.

Практическое значение полученных результатов. Предложенный метод оценки ДЖО зоопланктона может быть использован для: (а) оперативной интегральной оценки состояния морской среды в условиях загрязнения; (б) ретроспективной оценки и прогнозирования масштабов элиминации зоопланктона в связи с естественными и антропогенными причинами; (в) балансовых расчетов функционирования исследуемых экосистем (потоков вещества и энергии).

Личный вклад соискателя. Диссертанту принадлежит положенная в основу патента (№ 99008) идея оцифровки изображений организмов и последующего анализа их цветовых характеристик для классификации на живые и мертвые. Автором были поставлены научные задачи исследования, разработаны планы их выполнения. Он самостоятельно проводил отбор и обработку проб. Лично проведено 54 эксперимента по разработке оригинальной методики определения ДЖО на культуре копепод и на естественном сообществе, также обработано 47 проб мезозoopланктона, в которых сфотографировано и оцифровано 17 410 особей.

Апробация работы. Результаты исследований докладывались на отечественных и международных конференциях и семинарах: VI международная научно-практическая конференция молодых учёных «Понт Эвксинский 2009», посвящённая экологическим проблемам водных экосистем (Севастополь, 21-24 сентября 2009 г.); межотдельский семинар «Методические подходы к оценке доли живых организмов зоопланктона» (Севастополь, 6 октября 2010 г.); II всеукраинская научно-практическая конференция студентов и молодых ученых: «Актуальные проблемы и перспективы развития природных наук» Запорожский национальный университет министерства образования и науки Украины, биологический факультет (Запорожье, 20 мая 2011 г.); VII международная научно-практическая конференция молодых учёных «Понт Эвксинский 2011» по проблемам водных экосистем, посвящённая 140-летию ИнБЮМ НАН Украины (Севастополь, 24 – 27 мая 2011 г.); II международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых: «Фундаментальные и прикладные исследования в биологии» Донецкий Национальный университет, биологический факультет (Донецк, 19-22 сентября 2011 г.); международный научно-технический семинар «Системы контроля окружающей среды – 2012» (24 – 28 сентября 2012 г., г. Севастополь, МГИ НАНУ); VII школа-семинар для молодых учёных и специалистов «Актуальные проблемы экологической безопасности Азово-Черноморского

региона – 2014», посвящённая 85-летию со дня рождения академика Г. Г. Поликарпова (Севастополь, 2 – 6 сентября 2014 года).

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 11 научных работ, в том числе 4 статьи (из них 2 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК), 1 патент на изобретение и 6 тезисов докладов в материалах конференций.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, 7 разделов, выводов и списка использованных источников (74 отечественных изданий и 56 иностранных). Работа изложена на 147 страницах машинописного текста, иллюстрирована 45 рисунками и 7 таблицами.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю, доктору биологических наук, профессору Самышеву Эрнесту Зайнуллиновичу, за постановку задачи исследования, за ценные советы и рекомендации на всех этапах работы, а также редакционную правку и терпение. Автор глубоко благодарен своим учителям – Мельник Т.А., Павловой Е.В., а также Минкиной Н.И., Поповой Е.В., Губановой А.Д., Алтухову Д.А., всему коллективу отдела функционирования морских экосистем и особо лаборатории микропланктона отдела планктона ИнБЮМ. Отдельную признательность автор выражает кандидату биологических наук, заведующему лабораторией микропланктона ИнБЮМ Муханову Владимиру Сергеевичу за мудрое руководство, тактичность, всестороннюю помощь и поддержку при выполнении работы. Автор благодарен коллективу кафедры гидробиологии Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова за отзывчивость и доброе отношение.

РАЗДЕЛ 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. История изучения и методологические аспекты оценки смертности зоопланктона

История методов определения доли живых/мертвых организмов в планктоне насчитывает более 100 лет – еще в начале прошлого века планктонологи отмечали в пробах большое количество мёртвых организмов и задумывались о методах достоверного определения их вклада в численность сообщества. Одна из первых попыток разделять планктонных копепод на живых и мёртвых к моменту вылова описана в отчёте «Research» по научно-исследовательскому рейсу в Бискайском заливе в июне – июле 1900 г. [89, *Farran, 1926*]. К мёртвым относили те экземпляры, «повреждения которых были очевидны». Эксперименты на таких крупных объектах, как беспозвоночные ракообразные, впервые были проведены в 1933 г. на лимнологической станции в Косине [34, 35, *Кастальская-Карзинкина, 1935, 1937*]. В ходе их проведения М.А. Кастальская-Карзинкина применяла подход, основанный на выявлении изменений в структуре организма при отмирании и дальнейшем распаде – разрушении мускулатуры, зернистости внутренних органов. После гибели организма, в первую очередь, нарушается целостность мышечных волокон в антеннах, абдоминальных сегментах, происходит отслаивание тканей от панциря в районе рострума [29, *Зелезинская, 1966*; 34, *Кастальская-Карзинкина, 1935*; собственные наблюдения автора]. При дальнейшем разложении (16 – 18 ч после смерти) увеличивается грануляция, участки мышечных волокон

приобретают форму округлых комочков, стираются границы между внутренними органами. Если процесс идет при комнатной температуре, спустя двое суток остаются пустые оболочки Copepoda и панцири Cladocera [29, Зелезинская, 1966; 34, Кастальская-Карзинкина, 1935]. Скорость разложения трупов зависит от температуры воды: разложение Copepoda при температуре 5°C происходит примерно в полтора раза медленнее, чем при температуре 17°C.

В пионерских исследованиях М.А. Кастальской-Карзинкиной [34, 35, Кастальская-Карзинкина, 1935, 1937] пробы пресноводного зоопланктона анализировали после стандартной фиксации формалином при обычных гидробиологических сборах. Планктонные организмы окрашивались 5%-ным водным эритрозином для более отчетливого выявления внутренних структур. С некоторыми дополнениями этот метод позднее использовала Л.М. Зелезинская [24-29, Зелезинская, 1965-1969], в задачи которой входило исследование естественной смертности морского зоопланктона. Она активно изучала явления так называемого «дождя» и «антидождя» трупов гидробионтов при помощи сконструированного для этой цели планктонного осадкомера и дополнила сведения о первых признаках разложения различных групп планктёров [26, Зелезинская, 1965]. Мёртвыми считались те организмы, в которых были заметны постмортальные изменения структуры мышц, т.е. трупы на начальных и более поздних стадиях разложения [29, Зелезинская, 1966].

Умирующие и мёртвые планктёры могут погружаться с некоторой скоростью на дно водоёма, создавая своеобразный «дождь» трупов. Однако образующиеся в процессе разложения пузырьки газа могут задерживаться под наружным скелетом, снижая, таким образом, удельный вес трупа, и, заставляя мёртвые особи парить в толще воды или всплывать к поверхности. Гидробионты с нейтральной или положительной плавучестью составляют явление «антидождя», имеющее те же причины возникновения, но направленное вверх [24, Зелезинская, 1969].

При изучении продуктивности водоёмов в 1978 г. Л.Г. Коваль также опиралась на подход визуального дифференцирования. При учёте живого и мёртвого зоопланктона в фиксированной пробе, как одного из путей оценки жизненных условий в море, мёртвые организмы отличались от живых по разрыву мышечных волокон, образованию зернистости под влиянием микроорганизмов и паразитов [38, *Коваль, 1978*]. Чтобы ускорить обработку проб, Коваль использовала этот метод без окрашивания эритрозином. Позднее, она издала монографию по зоо- и некрозоопланктону Чёрного моря. В работу вошли исследования структуры горизонтального и вертикального распределения живой и мёртвой фракций на шельфе и континентальном склоне, элиминации зоопланктона в разных районах моря, при этом выявлены некрогенные факторы, количественные показатели «дождя трупов» и скорость погружения отмерших планктёров в зависимости от степени разложения, размера животного, его формы, плотности воды [37, *Коваль, 1984*].

Решение разного рода задач требовало от исследователей данных о вкладе мёртвой компоненты в общую численность и биомассу планктона. Так, Т.С. Петипа при изучении трофодинамики копепод в морских планктонных сообществах отделяла мёртвых животных в формалиновых пробах от живых по явно мацерированным тканям тела и повреждённым покровам [65, *Петипа, 1981*]. Изучение пространственной структуры планктонных полей и её сезонной динамики при комплексных исследованиях северной части Чёрного моря, потребовало получения карт распределения некрозоопланктона в разных слоях в зимний период [11, *Грузов и др., 1994*]. В настоящее время ряд авторов при раздельном учёте живых и мёртвых организмов продолжают опираться на визуальную оценку состояния тканей, оболочек тела организмов, цвета и целостности хитинового покрова, состояния раковин и щетинок на конечностях [92, *Genin et al., 1995*; 98, *Kimmerer, McKinnon, 1990*; 106, *Pavlova, Kuftarkova, 1995*; 131, *Svetlichny et al., 2006*; 120, *Terazaki, Wada, 1988*], а также

физиологического состояния (подвижности) [129, *Zajączkowski, Legeżyńska 2001*]. Так, например, исследования структуры планктонного сообщества в прибосфорском районе Чёрного и Мраморного морей, где смешиваются водные массы с различными физико-химическими параметрами, показали массовую гибель *Acartia clausi* (до 88%) в слое солёностного градиента [12, *Губарева, Светличный, 2008*; 131, *Svetlichny et al., 2006*].

Иностранные авторы в своих работах также опирались на анализ состояния тел зоопланктёров, в частности, отсутствие внутренних тканей между цефалоном и торакальным сегментом, хотя экзоскелет мог выглядеть неповреждённым [95, *Harding, 1973*; 124, *Weikert, 1977*; 127, *Wheeler, 1967*]. В течение десяти рейсов с 1970 по 1985 гг. в планктонных пробах, собранных в Японском море, обнаруживали трупы массового вида мезо- и батипелагического слоя *Calanus cristatus*. К погибшим относили особи с разрывами между головой и грудным сегментом, заметным отсутствием мышечной ткани в области цефалона (рис. 1.1) [120, *Terazaki, Wada, 1988*].

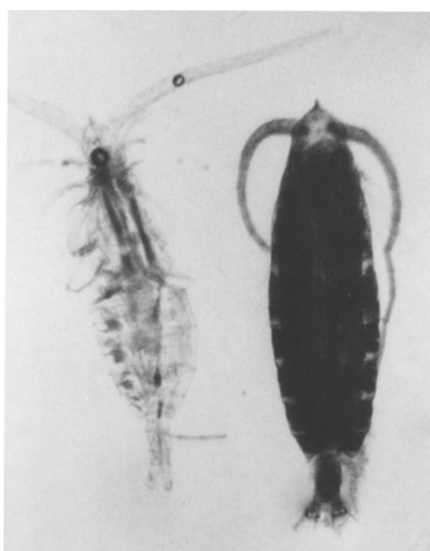


Рис. 1.1. — Дорсальная проекция мёртвого (слева) и живого (справа) копепода V стадии *Calanus cristatus* по [120, *Terazaki, Wada, 1988*]

Так, обнаружение в зоопланктонных пробах в Красном море необычайно высоких значений мёртвых копепод потребовало от

исследователей классифицировать ракообразных на три категории: «оболочки», пустые экзоскелеты без внутренних тканей или с минимальным их количеством (без отличий от экзувий); «маргиналы», особи с распадающимися, гниющими внутренними структурами; «живые» - без повреждений [92, *Genin et al.*, 1995].

Наряду с визуальным разделением получили своё развитие и методы, основанные на окрашивании проб планктона различными красителями. Главное в такой оценке – не признаки разложения организма, а наличие (или отсутствие) у него специфической окраски. В практике зоопланктонных исследований применяется большое количество красителей различной химической природы. По способности проникать через живые мембраны их условно можно разделить на две группы: витальные (прижизненные) и постмортальные (посмертные) [69, *Александров*, 1991]. К первой группе относятся красители, хорошо проникающие в живые клетки и связывающиеся с различными органическими соединениями посредством ионных или ковалентных связей. При этом живые организмы приобретают цвет красящего вещества, а мёртвые остаются неокрашенными [2, *Александров, Аблов*, 1988]. Среди них – акридиновый оранжевый, диацетат флуоресцеина (ДФ), нейтральный красный (НК).

В 70-е годы в практике гидробиологических исследований начали широко применяться флуоресцентные красители (в частности, акридиновый оранжевый, ДФ) благодаря их свойству превращать часть *поглощённой* энергии падающего света в излучаемый свет – флуоресценцию, которая может регистрироваться, например, с помощью флуоресцентной микроскопии. Основное преимущество этого метода – его большая чувствительность наряду с высокой контрастностью изображения [72, *Фрайштат*, 1977].

Акридиновый оранжевый (АО) относится к группе основных флуорохромов, вступает в реакцию с нуклеиновыми кислотами независимо

от локализации последних в клетке, *in vivo* он реагирует с ядерными ДНК и РНК и проявляет слабое сродство к внеядерным нуклеиновым кислотам [2, Александров, Аблов, 1991]. При освещении лучами с длиной волны 470 – 490 нм АО флуоресцирует оранжевым или зеленым цветом – в зависимости от концентрации красителя, состава стенки клетки и соотношения РНК и ДНК в цитоплазме. В ассоциации с РНК проявляется оранжевое (красное) свечение, а с ДНК — зеленое [108, Porter, Feig, 1980]. Принято считать, что у жизнеспособных клеток более высокие величины соотношения РНК к ДНК, чем у мертвых. Клетки, окрашенные в оранжевый цвет, идентифицируют как живые, в зеленый — как мертвые [70, Старосила, 2006]. По другим источникам, АО позволяет отличать живую протоплазму от мёртвой, вызывая у первой зелёную, а у второй – красную флуоресценцию [71, 72, Фрайштат, 1977, 1980]. В 70 - 80 гг. XX века для прямого счёта в естественных образцах широко использовали окраску водных бактерий с помощью АО для оценки под эпифлуоресцентным микроскопом [91, Francisco et al., 1973], в обычной и флуоресцентной микроскопии для выявления нуклеиновых кислот и кислых мукополисахаридов в клеточных и тканевых структурах [71, Фрайштат, 1980]. Применение АО для дифференцированного учёта живых и мёртвых организмов морского зоопланктона [2, 69, Александров, Аблов, 1988, 1991] не получило распространения [43, Литвинюк, 2009]. В современных исследованиях этот краситель используют, как правило, только в комплексе [105, Onji et al., 2000].

Диацетат флуоресцеина (ДФ) – гидрофобное нефлуоресцирующее соединение, легко проникающее в клетку через клеточную мембрану, где оно подвергается метаболизму при участии клеточных эстераз с образованием флуоресцеина, обладающего зелёной флуоресценцией. ДФ не способен проникать через повреждённые мембраны и сохраняется только в цитоплазме жизнеспособных клеток с интактной цитоплазматической мембраной. Это один из современных витальных

флуоресцентных маркеров активности ферментов группы эстераз в живых клетках (в том числе, многоклеточных организмов) и вне их (например, бактериальных экзоферментов в биопленках). ДФ широко используется в исследованиях бактерий и фитопланктона [105, *Onji et al.*, 2000] и лишь недавно нашёл применение в работах, связанных с зоопланктоном, а именно, при определении доли живых эмбрионов копеподы *Calanus helgolandicus* [109, *Buttino et al.*, 2004].

Наибольшее распространение среди витальных красителей получил нейтральный красный ($C_{15}H_{16}N_4 \cdot HCl$) – основной анилиновый краситель, взаимодействующий с нуклеиновыми кислотами, кислыми белками и другими соединениями кислотного характера. По другим данным, НК способен поглощаться и накапливаться лизосомами жизнеспособных клеток [110, *Repetto et al.*, 2008; 118, *Tang et al.*, 2006]. НК – один из самых распространённых витальных (суправитальных) красителей, который широко применяют в цитологии, гистологии, медицине, биологии [97, *Horvath, Lamberti*, 1999; 105, *Onji et al.*, 2000; 110, *Repetto et al.*, 2008; 122, *Tomasovic et al.*, 1989; 128, *Yamamoto, Takeuchi*, 1983]. В обычной микроскопии нейтральный красный применяют для бактериологических, ботанических и гистологических исследований, для окраски ядер и др.; в флуоресцентной микроскопии для выявления жировых и липоидных веществ и в качестве витального красителя для прижизненной окраски клеток, тканей, органов и т. д. [71, *Фрайштат*, 1980]. Окрашивать нейтральным красным морских планктонных ракообразных в 1972 г. предложили Дрессел с соавторами [83, *Dressel et al.*, 1972]. Они сравнили действие различных красителей и получили удовлетворительные результаты в экспериментах с двумя видами копепод, окрашенных НК, – *Acartia tonsa* и *Eurytemora affinis*. Позднее этот метод окраски НК был модифицирован Кофланом и Флемингом [90, *Fleming, Coughlan*, 1978], которые предложили для фиксации окрашенных организмов использовать щелочной формалин (pH=9). В таком формалине животные были

бесцветны, но сохраняли краситель в себе длительное время. Интенсивный красный цвет мог быть легко восстановлен (когда это необходимо) с помощью подкисления пробы. Таким образом, эта модификация позволяла обрабатывать большие объёмы материала в полевых условиях. В настоящее время НК используют не только как самостоятельный краситель для дифференцирования живых/мёртвых многоклеточных организмов [42, Литвинюк, Аганесова, 2009; 81, Crippen, Perrier, 1974; 118, Tang et al., 2006] и микроводорослей [105, Onji et al., 2000], а также в сочетании с красителями другого спектра действия [59, Ряпенко, Полюнов, 1991; 105, Onji et al., 2000]. Нейтральный красный применяют преимущественно при исследованиях морского и эстуарного зоопланктона [81, Crippen, Perrier, 1974; 86, Elliott, Tang, 2009]. Попытки применить его для исследования пресноводных зоопланктёров в условиях мелководного Куршского залива Балтийского моря были достаточно успешными [64, 65, Семёнова, 2010], однако, для указанной акватории, вследствие ряда методических недостатков подходящим оказался метод окрашивания анилиновым голубым красителем, что подствеждено дальнейшими работами автора [63, Семёнова, 2011; 113, Semenova, 2011].

Постмортальное окрашивание осуществляется с использованием красителей, не проникающих через живые мембраны и поэтому окрашивающих либо повреждённые, либо мёртвые организмы (клетки) [2, Александров, Аблов, 1991]. Мертвыми организмами считают особи с сильно или слабо окрашенным хитиновым покровом и сильно окрашенными внутренними структурами тела [21, Дубовская и др., 1999; 45, Наумова, 2006; 112, Seepersad, Crippen, 1978]. 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 [2, *Александров, Аблов, 1991*]. Попытки использовать проционовые (активные) красители, ярко-голубой RS и ярко-красный 5BS, для морского и пресноводного зоопланктона были сделаны в 1982 г. В. Б. Ивановым с соавторами [32, *Иванов, 1982*]. Красители проявили слабое сродство к личинкам гастропод и бивальвий, но в целом показали удовлетворительные результаты. Проционовый красный успешно применён и в современных исследованиях мёртвого пресноводного зоопланктона [45, *Наумова, 2006*; 59, *Ряпенко, Польшов, 1991*]. Reactive red 120 (проционовый ярко-красный Н-ЕЗВ) способен окрашивать ткани нарушенного хитинового покрова членистоногих. В частности, прибегнув к окраске проб этим маркером, в оз. Байкал в 2000 г. в течение периода активной вегетации водорослей рода *Aulacoseira* (март-май), в слое ее максимальной концентрации 0-50 м удалось зафиксировать массовую гибель байкальской эпишуры (рода *Epischura*), особенно науплиусов (до 80%). Так, в марте-июне 2001 г., когда средняя за период вегетации численность водорослей рода *Aulacoseira* в слое 0-50 м не превышала 30 тыс.кл./л, доля мертвых рачков была намного меньше (до 20%) [45, *Наумова, 2006*].

В практику исследований пресных вод успешно вошёл анилиновый голубой водорастворимый. Методика его применения была разработана в 1978 г. Сиперсадом и Криппеном [112, *Seepersad, Crippen, 1978*] и в настоящее время используется в институте биофизики Сибирского отделения РАН (Красноярск) для изучения причин естественной смертности планктонных ракообразных [8-10, *Гладышев, 1993, 2003*; 16 – 21, *Дубовская, 1987-2009*; 84, 111, *Dubovskaya, 2005, 2008*], а также в Атлантическом научно-исследовательский институте рыбного хозяйства и океанографии в Калининграде [63-66, 113, *Семёнова, 2009, 2010, 2011*]. Для полевого окрашивания зоопланктона с целью последующей дифференциации живых и мёртвых особей в фиксированных пробах разработан специальный прибор – стейнер, облегчающий и ускоряющий

процесс окраски [10, *Гладышев, 1993*; 19, *Дубовская, 2008*]. Разработаны методические рекомендации по использованию этого красителя [19, *Дубовская, 2008*; 78, *Bickel et al., 2009*; 64, 65, *Семенова, 2010*].

Два противоположных методических подхода закономерно имеют ряд достоинств и недостатков (табл. 1.1). Что касается визуального дифференцирования живого/мёртвого планктона, то нужно отметить следующее. Первые видимые признаки разложения у Copepoda и Cladocera в экспериментах при комнатной температуре появляются спустя 2,5 – 3 часа [29, *Зелезинская, 1966*], 3 – 4 часа после смерти [34, *Кастальская-Карзинкина, 1935*]. Эти признаки хорошо заметны под микроскопом. Полное разложение мягких тканей в опытах заканчивалось в течение 200 – 250 ч [29, *Зелезинская, 1966*]. Таким образом, появление некроза тканей только через несколько часов после гибели неминуемо приводит к недоучёту мёртвых зоопланктёров, а сам метод требует внимательности и скрупулезности исследователя, значительных затрат времени на обработку пробы. Кроме того, сохраняется высокая субъективность оценки состояния организма, так как изменения морфологических структур специфичны для разных видов и таксонов. Основное преимущество этого метода состоит в том, что работа ведётся на фиксированном материале. Таким образом, сохранённые на длительный период пробы могут быть обработаны в любое время после консервации, что удобно, например, в условиях рейса, когда собирается большое количество проб. Отсутствие временных и материальных затрат при подготовке к работе делает подход легко доступным. К тому же, гарантированный учёт явно мёртвых организмов внушает уверенность в полученных данных.

Таблица 1.1.

Основные достоинства и недостатки методов раздельного учёта
живого/мёртвого зоопланктона

	Визуальный метод	Методы окрашивания
Достоинства	1. Работа на фиксированном материале 2. Отсутствие временных и материальных затрат при подготовке к работе 3. Гарантированный учёт явно мёртвых организмов	1. Простота метода, высокая эффективность и скорость работы 2. Достоверность получаемых результатов 3. Возможность применения современных методов анализа данных
Недостатки	1. Недоучёт недавно погибших организмов 2. Длительность и трудоёмкость исследований 3. Большой опыт работы с зоопланктоном 4. Субъективность оценки	1. Ограниченность времени обработки пробы из-за потери цвета при длительном хранении 2. Необходимость специальных расходных материалов и оборудования 3. Субъективность оценки

В свою очередь, методы окрашивания, как и любые другие методы, имеют ряд достоинств и не лишены недостатков. Поскольку исследователь регистрирует только наличие или отсутствие окраски у организмов, скорость и эффективность обработки и оценки материала высока. Достоверность результатов обеспечивается, во-первых, простотой критерия оценки (2 варианта – окрашенный или неокрашенный организм), во-вторых, окраска пробы позволяет получить данные о соотношении живых и

мертвых зоопланктёров на момент их отбора (точный момент смерти). Но главным преимуществом методов окраски, на наш взгляд, является возможность применения современных методов анализа данных. Что касается недостатков, то главный из них – это то, что обработка проб должна быть произведена в относительно короткое время, желательно – в день отбора и окраски, либо в ближайшие дни. Несмотря на то, что существуют способы сохранения маркеров в телах зоопланктёров (п. 2.14.), время обработки проб ограничено. Немаловажный фактор – это стоимость маркеров, к тому же необходимо время для подготовки к окраске.

К недостаткам обоих подходов следует отнести субъективность самой процедуры идентификации исследователем живых или мёртвых организмов. При применении визуального метода от квалификации исследователя зависит его способность распознавать первые признаки разложения организма и, следовательно, результат всего анализа. Если применяется окраска пробы специфическим красителем, то исследователь оценивает степень и интенсивность окраски особи и принимает решение, к какой категории его отнести – живым или мертвым. Это решение не всегда просто принять, поскольку в природных пробах зоопланктона многие организмы окрашиваются фрагментарно или их окраска недостаточно выражена. Как следствие этого, ошибка определения ДЖО, связанная с субъективностью решений исследователя, может быть значительной. При всей её сложности, проблема субъективности процедур идентификации живых/мёртвых организмов может быть решена, по крайней мере, для методов окраски. Этой теме и посвящено данное исследование.

Анализ литературных данных показал, что, несмотря на то, что задача поиска оптимального метода идентификации живых/мёртвых зоопланктонных организмов поставлена достаточно давно, единого и общепринятого подхода на настоящее время не существует. В связи с этим сохраняется актуальность разработки усовершенствованной и

универсальной методики определения ДЖО в зоопланктоне, позволяющей получать воспроизводимые и достоверные результаты.

1.2. Данные о соотношении живых и мёртвых организмов зоопланктона в разных районах Мирового океана (обзор)

1.2.1. Состояние вопроса в Севастопольской бухте и побережье.

Данные о некрозоопланктоне прибрежных вод Севастополя и в Севастопольской бухте немногочисленны и представлены, в основном, в работах Е. В. Павловой с соавторами [49-54, *Павлова и др.*, 1995-2011; 76, 106, *Pavlova et al.*, 1995, 2007], которая применяла визуальный метод определения доли мёртвых организмов в сообществе. В 1988 – 1990 гг. на выходе из Севастопольской бухты (станция в Мартыновой бухте) была проведена оценка смертности доминирующих в зоопланктоне видов в разные сезоны года [54, *Петина, Павлова, 1995*]. У представителей *Soropoda* всех стадий развития доля мёртвых особей, как правило, увеличивалась весной и летом до 30 – 35 %, а в ноябре 1990 г. отмечено её резкое повышение до 60 %. У периодически встречающихся видов этот показатель изменялся в пределах 10 – 30 %. Максимальные величины получены для *Noctiluca scintillans*: летом 1990 г. – 42 – 98 %, осенью и зимой – 12 – 15 % [54, *Петина, Павлова, 1995*].

В те же годы (1988 – 1990 гг.) в летний сезон было обнаружено значительное количество некрозоопланктона и в других прибрежных районах Севастополя [67, *Павлова и др.*, 1999, с. 87]. Доля мёртвых организмов увеличивалась в направлении от бухты Казачьей (30 – 40 %) к бухтам Камышовой, Стрелецкой, Круглой, Севастопольской и далее – до района впадения в море реки Бельбек (60 – 70%) [76, *Pavlova et al.*, 2007]. В частности, в б. Круглой доля некрозоопланктона в летнее-осенний период

1988-89 гг. составляла 45 %, а в 1990 г. – достигала 75 % [50, Павлова, Мельникова, 2006].

Данные 1998 г., собранные в Севастопольской бухте, показали, что количество мёртвых организмов увеличивалось от мая к сентябрю. Так, у входа в бухту процентное отношение мёртвых организмов (к общему количеству обнаруженных) увеличивалось от 22 % до 40 %, в районе Нефтегавани – от 37 до 43 %, а в бухте Южной – от 53 в мае до 74 % в сентябре. По данным авторов, наиболее чувствительными к загрязнению были ракообразные (Copepoda, Cladocera), личинки Cirripedia (*Balanus improvisus*) и *N. scintillans*, число мёртвых особей в этих группах превышало 50%. Более устойчивы к загрязнению личинки Mollusca и Polychaeta.

Сопоставление результатов по Севастопольской бухте с относительно чистым районом бухты Омега, показало, что и там доля мёртвого зоопланктона росла, особенно в конце лета: от 1,5 в мае до 54 % – в августе и 42 % – в сентябре [1, стр. 88; 52, Павлова, 1999, 2005].

В теплый сезон (май-октябрь) 1998 – 2003 гг. доля некрозоопланктона на двух точках Севастопольской бухты (Константиновский равелин, б. Южная) (рис. 1.2) и на входе в б. Круглая (условно чистый район) изменялась от года к году в значительных пределах: от 11 до 57 %.



Рис. 1.2. Районы исследования некрозоопланктона в Севастопольской бухте и прибрежных водах по [50, 51, 76, Павлова и др., 2006, 2007, 2011].

Анализом многолетней динамики количественных показателей и доли некрозоопланктона прибрежных вод Севастополя в теплые месяцы (табл. 1.2) выявлены максимумы численности погибших организмов в 1998 и 1999 гг. в б. Южная – соответственно, 49 ± 7 и 57 ± 7 %. В б. Круглой эти же величины составляли 32 ± 2 и 36 ± 8 %, в б. Севастопольской – 35 ± 6 и 36 ± 8 %. Наименьшие величины отмечены в 2000 г. на всех трёх точках (б. Южная – 25 ± 4 %, б. Севастопольской – 11 ± 2 %, б. Круглая – 19 ± 5 %) [50, Павлова, Мельникова, 2006]. Сравнивая эти районы, авторы отмечали, что низкие численности некрозоопланктона, наблюдаемые в б. Круглая, соответствовали низким значениям биомассы и численности живых организмов [50, Павлова, Мельникова, 2006].

Сходные данные для исследованных районов были получены по меропланктону в 1998 – 1999 гг. Максимальные численности мёртвых личинок Cirripedia, Polychaeta, Bivalvia и Gastropoda выявлены на станции в б. Южная (54 – 55 %), минимальные – в б. Круглой (17 – 18 %) [76, Pavlova et al., 2007].

По итогам исследований некрозоопланктона Севастопольской бухты и побережья в 1998 – 2006 гг. в [51, Павлова, Мельникова, 2011] установлено, что ДЖО зоопланктона в бухтах Круглая и Севастопольская (станция у входа в бухту, рис. 1.2) колебалась от 51 до 93 %, в Южной – от 40 до 77 %. Наибольшие за весь период исследований величины отмечены в 2000 и 2001 гг. в бухтах Круглая (87 %) и Севастопольская (93 %), наименьшая – в б. Южная (43 %). В б. Южная ДЖО Cladocera составляла от 26 до 67 %, Copepoda – 41 – 52 %, меропланктона – 26 – 85 %. В двух других районах (б. Севастопольская, б. Круглая) ДЖО Cladocera менялась от 62 до 80 %, Copepoda – от 52 до 87 %, личинок бентосных животных – от 62 до 90 % [51, Павлова, Мельникова, 2011].

Таблица 1.2

Численность (экз. м⁻³), биомасса (мг. м⁻³) и ДЖО зоопланктона в акватории Севастополя в период 1998 – 2006 гг. (средние за май – октябрь) по [51, Павлова, Мельникова, 2011]

Год	б. Круглая			б. Севастопольская			б. Южная		
	экз./м ³	мг/м ³	%	экз./м ³	мг/м ³	%	экз./м ³	мг/м ³	%
1998	3000±1700	167±110	67	3678±1750	147±90	65	1390±650	19±9	43
1999	1860±568	17±5	70	3200±857	33±6	70	3856±1320	42±13	50
2000	3200±2000	54±16	83	8370±3000	83±34	93	11900±7320	167±82	77
2001	4800±3000	123±29	87	9345±2500	218±74	80	6200±3928	107±64	61
2003	Нет данных			2625±1064	66±35	76	2250±780	55±31	65
2004	- « -	- « -		2106±1510	99±90	76	162±140	4±3	42
2005	663±270	29±13	51	2916±1230	133±78	62	1910±599	57±13	44
2006	3352±1793	82±20	63	1954±345,3	105±40	57	1409±164	41±15	40

Напомним что, в Севастопольской бухте и побережье количественная оценка некрозоопланктона была впервые проведена в 1988 – 1990 гг.¹ При дальнейшем мониторинге было показано, что мёртвая фракция является постоянным компонентом зоопланктонного сообщества этого района [51, Павлова, Мельникова, 2011]. С 2003 по 2006 г. ДЖО зоопланктона бухт Круглой и Севастопольской (табл. 1.2) составляла в среднем 70±3 % (Cladocera – 69 %, Copepoda – 67 %, личинки бентосных животных – 75 %), в бухте Южной – 54±5 %, (Cladocera – 35 %, Copepoda – 48 %, меропланктон – 50 %) [51, с. 40, Павлова, Мельникова, 2011]. Значительный вклад погибших организмов в общую биомассу и численность

¹ Автор встречал некоторые упоминания работ Делало Е. П. по Севастопольской бухте в 1953 г., однако опубликованных данных найдено не было

зоопланктона и высокая вариабельность этого показателя подчеркивают необходимость разработки и применения специальных методов определения ДЖО в сообществе.

1.2.2. Распределение мёртвой фракции зоопланктона в Чёрном море и других районах Мирового океана.

Чёрное море. В августе 1963 г. анализ осадка, скопившегося в течение суток в подводной ловушке-осадкомере, установленной на глубине 10 м в районе Одессы (с. Черноморка), показал, что общее количество трупов зоопланктёров доходило до 30 000, то есть 3 организма на 1 см² (18 160 трупов копепод на 1 м² морского дна). В отдельных случаях при просмотре проб сетного планктона до 15 % организмов в них оказывались мёртвыми [24, 29, Зелезинская, 1966, 1969]. В 1964 г. в этом же районе доля мёртвых *Acartia clausi* составляла от 1 до 100 %, в среднем 25 % [25, с. 18, Зелезинская, 1966].

На шельфе и континентальном склоне северо-западной части Чёрного моря, в приустьевых районах рек в период 1962 – 1977 гг. количество и роль некрозоопланктона были предметом исследования Л. Г. Коваль [37, Коваль, 1984]. На большом полевом материале было показано, что значительная часть зоопланктонных проб содержала мёртвую составляющую. В 1973 г. в северо-западной части моря максимальные значения мёртвой фракции зоопланктона в слоях воды 0 – 10 и 10 – 25 м (рис. 1.3.) отмечены в приустьевых районах гидрофронтов рек, где зоопланктон гибнет от неблагоприятных условий на стыках разнородных водных масс при значительных градиентах температуры, солёности и плотности воды. «В этих районах гидрологи отмечали повышение окисляемости и понижение содержания в воде кислорода, что обычно сопутствует процессу минерализации» [37, с. 47, Коваль, 1984]. Наибольший вклад мёртвой фракции отмечен в слое 25-50 м в придунайском районе (до 200 мг/м³). Данные 1975 г. свидетельствовали о

том, что с апреля по июнь количество мёртвого зоопланктона увеличивалось с глубиной: от 0,3 до 35 % на 25-33 м (см. рис. 1.4.) Таким образом, по заключению автора, происходила седиментация и отток органических осадков на дно шельфа и в глубины моря.

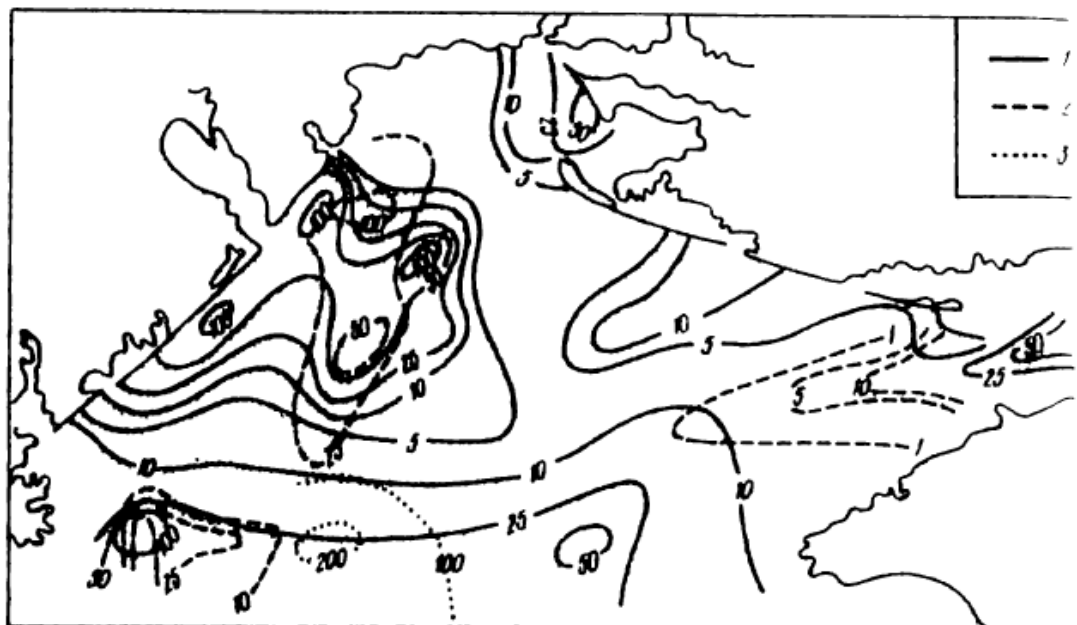


Рис. 1.3. Распределение некрозоопланктона в августе 1973 г. : 1 – в слое 0–10 м, 2 – в слое 10 – 25 м, 3 – в слое 25 – 50 м по [37, Коваль, 1984].

Отдельно указанным автором оценена смертность наиболее массового и кормового для пелагических рыб веслоного рачка *Acartia clausi*. Биомасса акарции в тотальном слое с.-з. части Чёрного моря в 1977 г. была на порядок выше вклада других представителей рачкового зоопланктона ($5,02 \text{ мг/м}^3$ – живых, $3,00 \text{ мг/м}^3$ – мёртвых) [37, с. 64, Коваль, 1984]. В популяции *A. clausi* погибали все стадии развития рачка, однако максимальная доля мёртвых организмов приходилась на молодые стадии (63 – 72 % для I – IV стадий) и на взрослых самок (52 %), которые для нереста поднимаются в поверхностные слои воды. В меньшей степени погибали самцы – 30%, и науплии V стадии развития, обычно располагающиеся глубже в менее загрязнённых слоях воды [37, с. 65-66, Коваль, 1984].

Фракция	Глубина, м		
	0-10	10-25	25-33
<u>Апрель</u>			
Живая	493	173	87
Мертвая	16,53	14,87	24,1
% мертвой	3,3	7,9	20,0
<u>Май</u>			
Живая	265	171	-
Мертвая	16,99	53,72	-
% мертвой	6,0	23,0	-
<u>Июнь</u>			
Живая	6195	1098	106
Мертвая	18,74	43,87	56,87
% мертвой	0,3	2,9	35,0

Рис. 1.4. Вертикальное распределение зоо- и некрозоопланктона на северо-западном шельфе Чёрного моря в 1975 г., мг/м³ [37, Коваль, 1984]

В 1992 – 1993 гг. сотрудниками УкрНЦЭМ проводился комплексный океанологический мониторинг пространственно-временной структуры планктонных полей северной половины Чёрного моря, в задачи которого, наряду с прочими, входило получение данных по доле мёртвых организмов в шельфовых зонах и глубоководной части моря, особенно вблизи сероводородных слоёв. К мёртвым относили копепод с явными признаками разрушения. Л.Н. Грузов с соавторами показали, что в открытых водах в зимний период 1992-1993 г. доля мёртвых Copepoda батипланктонного комплекса составляла в разных районах (зона дивергенции в центре моря; зона, примыкающая к свалу глубин; северо-западная часть) от 3 до 24 %, а эпланктонного – от 4 до 25 % [11, рис. 9, 1, Грузов и др., 1994]. В слое 0 – 10 м некрозоопланктон в обоих комплексах составлял 10 – 25 % (в прибрежных районах – до 50 %) от общей численности копепод [11, рис. 3, 4, Грузов и др., 1994]. При такой низкой доле мёртвой фракции живые особи составляли в среднем 75 – 90 %, что значительно выше данных, приводимых другими авторами [37, Коваль, 1984; 51, Павлова, Мельникова, 2011]. К тому же, доля погибших копепод закономерно увеличивалась с

глубиной, достигая 75 – 100% в слоях глубже 75 – 100 м. Причём не во всех случаях эти слои характеризовались наличием следов сероводорода или дефицитом кислорода [11, с. 104, Грузов и др., 1994].

Что касается работ, проводимых в области дифференцированного учёта зоопланктона в разных районах Мирового океана и внутренних водоёмах, некоторые данные представлены на рис. 1.5. [101, Tang et al., 2009].

Одни из первых сведений о количестве живых/мёртвых особей в глубоководных планктонных пробах – представлены в отчёте «Research» по рейсу в Бискайский залив в 1900 г. [89, Farran, 1926]. К сожалению, авторы не приводят точного методического описания проведённых работ, но, вероятно, это первая попытка дифференцирования зоопланктона на живой и мёртвый. Результаты вертикальных ловов показали, что доля мёртвых организмов возрастала с глубиной. Так, величины ДЖО, рассчитанные нами по данным авторов, составляли в разных слоях: 50% (900 – 1300 м, в оригинале – 750 – 500 fathoms), 23-48% (1300 – 1800 м, 750–1000 f), 13-52% (1800 – 2200 м, 1250 – 1000 f), 10% (2200 – 2700 м, 1500 – 1250 f). В слое 2700 – 3600 м (2000 – 1500 f) ДЖО составляла 57%, однако этот результат мог быть артефактом из-за малой выборки организмов (23 экз.) [89, Farran, 1926].

Во время исследований вод олиготрофного Саргасового моря на глубинах от 2000 до 4000 м в планктонных пробах было зафиксировано значительное количество мёртвых копепод, таких как *Calanus sp.*, *Spinocalanus magnus*, *Pleuromamma xiphias*, *Lucicutia sp.*, *Heterorhabdus sp.*, *Haloptilus sp.* [127, Wheeler, 1967]. На значительных глубинах в Японском море в 1970-1985 гг. также обнаруживали множество погибших *Calanus cristatus* на VI и V стадии развития в слое между 15 - 300 м ниже хорошо выраженного термоклина – 169 экз./1000 м³, и копеподитов V стадии в слое 1500-2000 м – 1573 экз./ 1000 м³ [120, Terazaki, 1988]

В феврале-марте 1972 г. в районе апвелинга у побережья северо-западной Африки доля мёртвых копепод (*Тетона spp.*) составляла 16 – 28% от общего числа копепод в океанической и шельфовой зоне [124, *Weikert, 1977*].

В 1993 г. в озере Констанц (Германия) естественная смертность *Daphnia galeata*, определённая по сборам седиментационных ловушек составила 23% от общей смертности при суточных потерях 2,3 % сут⁻¹ [93, *Gries, Güde, 1999*] (рис. 1.5).

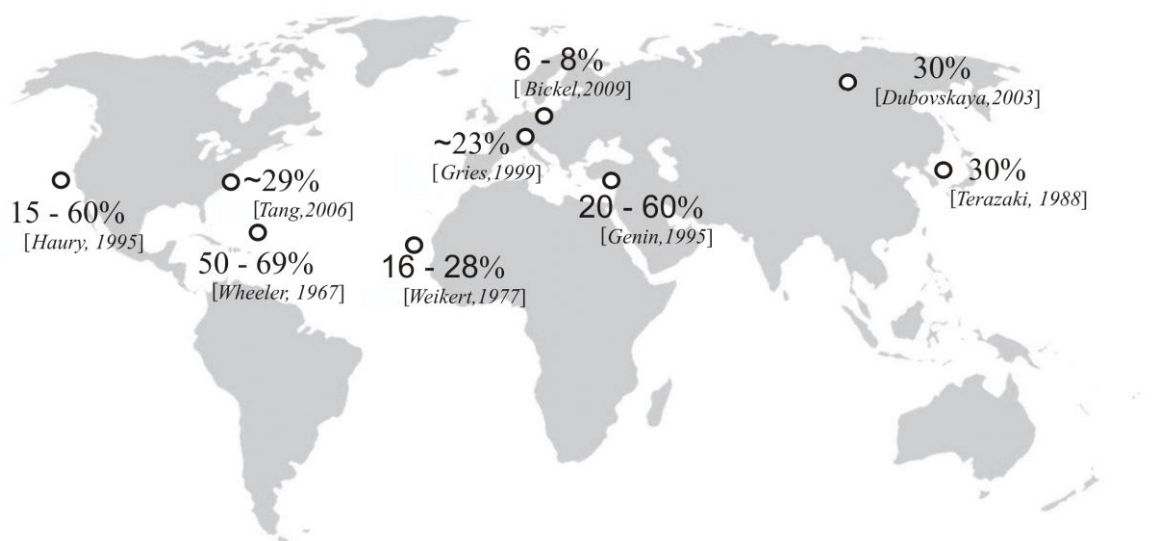


Рис. 1.5. Доля мёртвого зоопланктона в разных районах Мирового океана и внутренних водоёмах. Объяснения в тексте [по 101, *Tang, 2009*]

Исследованиями, проведёнными в северной части залива Эйлат (Красное море) около кораллового рифа с июля по сентябрь 1990 и 1991 гг., установлены необычно высокие значения в планктоне мёртвых копепод – 20 – 60% [92, *Genin, et al. 1995*].

Вклад естественной (не связанной с хищниками) смертности в общую смертность *Daphnia* в озере Бугач (окрестности г. Красноярска, Сибирь), оценивали в 1997 г. [84, 115, *Dubovskaya, 1999, 2008*], когда общая смертность рассчитывалась по модели [107, *Polishchuk, Ghilarov, 1981*]. В среднем, не связанная с хищниками смертность дафний, определенная на основе учета мертвых и их удельной скорости осаждения (по данным

седиментационных ловушек) была на уровне 30 % от общей [84, 115, Dubovskaya, 1999, 2008].

Летом 2005 г. в низовье Чесапикского залива (восточное побережье США) в зоопланктоне наблюдали в среднем до 29% погибших копепод (рис. 1.5), причём практически на всех исследованных станциях Copepoda достигали 90% от общей численности зоопланктона и были на 70-100% представлены *Acartia tonsa* [118, Tang et al., 2006]. В этом же районе в период с 2007 по 2009 гг. средняя доля мёртвых *A. tonsa* составляла 30 % для науплиусов I – III стадий развития, 12 – 15 % – NIV–NVI стадий и копеподитов I – VI стадий. Половозрелые *A. tonsa*, в среднем, за указанный период, были представлены 40 % мёртвых самцов и 9 % самок. Авторы сделали вывод, что личинки акарции чаще гибнут на ранних стадиях развития, а смертность взрослых самцов была почти в 4 раза выше, чем самок. Процент мёртвых особей реже встречающейся копеподы Чесапикского залива *Eurytemora affinis* был несколько ниже, чем у *A. tonsa*, составляя в среднем 4 % для копеподитов VI стадии и 8 % – CI – CIV [87, Elliott, Tang, 2011].

1.3. Основные причины гибели морского и пресноводного зоопланктона, не связанной с выеданием хищниками (обзор литературных данных).

Поиск так называемых «некрогенных факторов», или причин гибели планктонных организмов, не связанных с выеданием хищниками, является одной из основных задач при исследовании вопросов смертности планктона. По данным ряда авторов, зоопланктон погибает, в первую очередь, от голодания (т.е. количества и/или качества пищи), болезней и паразитов, вирусных инфекций, цветения вредоносных водорослей, от стрессов окружающей среды и загрязнения, и, в конце концов, от старости [18, Дубовская, 2009; 87, Elliott, Tang, 2011; 93, Gries, Güde, 1999; 95, Harding,

1973; 102, *Dunlap et al.*, 2013; 118, *Tang et al.*, 2006; 127, *Wheeler*, 1967]. К числу некрогенных факторов относится также резкая смена солёности воды и её ионного состава [24, *Зелезинская*, 1969], стгонно-нагонные явления, атмосферные осадки (дождь) [26, *Зелезинская*, 1965]. Изучение этого сложного и многогранного явления требует знаний о целом ряде составляющих. Различные факторы могут оказывать на гидробионтов как комплексное, так и прямое действие.

Возможные причины не связанной с хищниками смертности планктонных ракообразных подробно рассмотрены в обзорах [18, *Дубовская*, 2009; 130, *Tang et al.*, 2014]. В частности, изменение температуры воды, вызванное, например, прогревом водоёма до дна в жаркие летние дни, может приводить к резкому снижению численности холодолюбивых видов. Перепады температуры оказывают губительное воздействие на численность живого зоопланктона в результате сброса воды в водоёмы вблизи гидро- и теплоэлектростанций.

К физическим факторам, приводящим к гибели планктонных организмов, относят также ветер, мутность воды и скорость стокового течения [18, *Дубовская*, 2009]. Однако, в водоёмах умеренных широт высокая турбулентность от ветровых и стоковых течений, ультрафиолетовая радиация, высокая мутность воды – представляются маловажными, воздействующими эпизодически во времени и локально в пространстве. Мигрируя вглубь водоёма, зоопланктон способен избегать эти периодически возникающие неблагоприятные условия.

Рассматривая основные химические факторы, автор отмечает, что гибель планктонных ракообразных от недостатка в воде кислорода воздействует на популяцию отрицательно, но не через возрастание естественной смертности, а через замедление скорости роста. Так, представители рода *Daphnia* способны избегать зон без кислорода и, соответственно, гибели от его недостатка. К маловероятным факторам гибели рачкового зоопланктона автор также относит токсичность вод.

Успешное сосуществование токсичных цианобактерий и рачков-фильтраторов, по всей вероятности, связано с высокими адаптационными механизмами последних, проявляющихся в физиологической устойчивости к токсинам и способности избегать потребления токсичных клеток [18, Дубовская, 2009].

Проведённый Дубовской анализ литературных источников показал, что паразиты и эпибионты в значительной степени могут влиять на динамику численности зоопланктона не только через увеличение смертности особей, но и через уменьшение рождаемости за счёт гибели яиц. В целом, вероятность возрастания смертности в популяциях зоопланктона может быть достаточно большой в связи с присутствием паразитов и вызываемых ими болезней и инфекций [18, Дубовская, 2009]. Так, в северо-западной части Чёрного моря было установлено, что внезапное снижение численности ветвистоусого рачка *Penilia avirostris* (Dana) вызывается массовым грибковым заболеванием [24, 25, 28, 30, Зелезинская, 1966, 1969]. Число осевших за сутки в планктонный осадкомер *P. avirostris*, тела которых густо пронизаны гифами грибка, достигало 11 135 особей на 1 м² морского дна в начале августа 1963 г., и 10 056 – в 1964 г. [30, Зелезинская, 1966]. В августе 1966 г. при анализе сетных проб процентный вклад мёртвых пенилий в слое 0 – 15 м в среднем составлял почти 37 %, достигая максимума в 5-сантиметровом поверхностном слое (54 %) [28, Зелезинская, 1969]. Период высокой смертности пресноводной *D. galeata* исследователи также связывали с возможной видо-специфичной инфекцией, проявляющейся в виде чёрного пятна на карапаксе или абдомене дафний [93, Gries, Güde, 1999]. Инфицирование копепод паразитической динофлагелятой *Atelodinium* sp. наблюдали в морских пробах, собранных у берегов Австралии в 1982 – 1985 гг. Частота заражения взрослых самок *Paracalanus indicus* составляла 0 – 28,5 % с максимумами до 41 % инфицированных особей в сутки, тогда как самки V стадий были заражены гораздо реже (0 – 6,1 %) [98, Kimmerer, McKinnon, 1990]. Влияние вирусных

инфекций на мезоопланктонное сообщество практически не исследовано. При исследовании массовых видов каланоид копепод *Acartia tonsa* и *Labidocera aestiva* в бухте Тампа, штат Флорида, США в их тканях были выявлены вирусы AtCopCV и LaCopCV, общая численность которых достигала до $1,13 \times 10^5$ частиц на особь (для *L. aestiva*). Авторы предположили, что эти вирусы были одной из причин высокой смертности копепод [102, Dunlap et al., 2013].

Определять, в значительной степени, высокую смертность (или её индикатора – доли мёртвых организмов) по ряду литературных свидетельств могут такие трофические факторы, как количество и качество пищи [18, Дубовская, 2009; 93, Gries, Güde, 1999]. Недостаток в пище каких-то незаменимых компонентов (биогенных элементов или полиненасыщенных жирных кислот) может быть причиной не только низкой скорости роста, но и голодания из-за низкого качества корма. Хотя не всегда бывает ясно, за счёт чего происходит лимитирование планктонных ракообразных пищей – за счёт недостатка её количества или её качественной неполноценности [18, Дубовская, 2009].

В Севастопольской бухте в июле-августе 1998 г. [67, Акватория и берега, 1999] полученные гидрохимические характеристики дали возможность прийти к заключению, что увеличение смертности зоопланктона могло быть вызвано повышением на 4-5°C температуры воды по сравнению с данными многолетних её изменений в том же районе (за 1974-1983 гг.), а также снижением солёности. В бухте Южной со второй половины мая до сентября отмечалось высокое содержание нитратов, нитритов, а также снижение концентрации кислорода и прозрачности воды. Это свидетельствует о значительном увеличении эвтрофирования, что, по мнению авторов, и отразилось на количественных показателях зоопланктона [67, с. 88, Павлова и др.; 76, Pavlova et al., 2007]. Однако подобные выводы сделаны на основании анализа только части факторов, таких как температура, солёность, плотность, O_2 , PO_4^{2-} , NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , SiO_3^- , без

учёта вклада, например, нефтепродуктов, поллютантов или растворённой органики, в связи с чем, возможно, подобные выводы поспешны. Одновременные сборы показателей среды и биологического материала дали возможность показать, что гибель организмов зоопланктона в разных акваториях, прилегающих к г. Севастополю, связана с изменениями гидролого-гидрохимических условий и степени загрязнения вод [51, 52, Павлова, Мельникова, 2005, 2007; 76, Pavlova et al., 2011].

Причиной массовой гибели копепод может быть резкое изменение солёности, например, при таянии ледника. Так в экспериментальных условиях *Calanus* sp. из Конгсфьёрдена (Гренландское море) при падении солёности с 34,5 ‰ до 27‰ оставались живыми и сохраняли активное движение, снижение солёности до 4‰ приводило к гибели всех животных в течение 1 часа, тогда как – до 9 ‰ число трупов достигало 100 % через 15 мин [129, Zajaczkowski, Legeżyńska, 2001]. Работы [12, Губарева, Светличный, 2008; 131, Svetlichny et al., 2006] также подтверждают факт массовой смерти копепод (до 88% *Acartia clausi*), кладоцер, сагитт в слое солёного градиента Мраморного моря.

В Чесапикском заливе в мае 2010 г. провели исследование о влиянии турбулентности, создаваемой моторными судами различного размера, на смертность копепод [77, Bickel et al., 2011]. Анализ количества мёртвых *Acartia tonsa* в образцах, собранных горизонтальными ловами на станциях с разной интенсивностью судоходства показал, что доля мёртвых копепод составляет 34% на станции с высоким объёмом трафика, тогда как в точках с практически отсутствующим или ограниченным движением судов – 5,3 – 5,9 %. Непосредственное измерение погибших акарций в турбулентном потоке, создаваемом винтами морского транспорта, в среднем показало 14,3 %, и вне его – 7,7 %. Экспериментальные исследования также подтвердили увеличение доли мёртвого зоопланктона с увеличением интенсивности турбулентности, указывая, что турбулентность вызывает смертность [77, Bickel et al., 2011].

Массовую гибель зоопланктона в северо-западной части Черного моря наблюдали в приустьевых районах гидрофронтов рек и по ходу трансформации пресных вод [25, *Зелезинская, 1966*; 37, *Коваль, 1984, с. 48*] после анализа проб в уловах осадкомера и стандартного лова сетью Джеди. Постоянное образование органического вещества за счёт гибели пресноводного, солоноватоводного и морского зоопланктона связано было, по мнению авторов, с загрязнённостью речных вод различными детергентами, а также со значительными градиентами температуры, солёности и плотности воды в зонах контакта разнородных водных масс [37, *Коваль, 1984, с. 47–50, 106*] (см. рис. 1.3). «Локальные пятна концентрации мёртвого зоопланктона отмечены также в прибрежных районах моря, загрязнённых бытовыми сточными водами и ограниченными железобетонными сооружениями, в районах влияния вод системы Северо-Крымского канала, в акваториях прилегающих к крупным курортам и промышленным городам, в заливах и лиманах, где функционируют морские порты и смежных с ними акваториях» [, 37, *с. 106, Коваль, 1984*]. Нефтяное загрязнение, связанное с функционированием морских портов и разливами нефти, относят к одному из ключевых антропогенных факторов, оказывающих резко негативное влияние на зоопланктон и определяющего его высокую смертность [44, *Миронов, 1973*].

РАЗДЕЛ 2

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Методы и районы отбора проб морского зоопланктона

Полевую апробацию нового метода витальной окраски зоопланктона и исследование сезонной динамики ДЖО зоопланктона проводили на трёх станциях в Севастопольской бухте и побережье с августа 2009 по октябрь 2011 г. Зоопланктонные пробы отбирали преимущественно в утренние часы большой сетью Джеди (диаметр входного отверстия 37 см, размер ячеей фильтрующего конуса – 125 мкм) тотальным ловом с горизонтов 40-0 м на станции «2 мили» (ст. 1), 9-0 м на станции «Сухарная балка» (ст. 3.), 7-6-0 м – в бухте Южная (ст. 2) (рис. 2.1).

Материалы по общей численности сетного зоопланктона (с октября 2010 г. по октябрь 2011 г.) были любезно предоставлены сотрудниками отдела планктона ИнБЮМ Алтуховым Д.А., Поповой Е.В., Губановой А.Д. В работе также использованы данные по температуре, полученные сотрудниками отдела планктона в указанный период.

Анализ ДЖО проводился только для *Copepoda* в связи, во-первых, с важной экологической ролью этой группы и их существенным вкладом в численность и функционирование сообщества зоопланктона [55, Петина, 1981], и, во-вторых, с методическими трудностями идентификации живых/мёртвых организмов в других группах (см. раздел 5). Особое внимание уделили копеподе-вселенцу *Oithona davisae*. Долгое время вид определяли, как *Oithona brevicornis* [119, Temnykh, Nishida, 2012]. *O. davisae* постоянно обнаруживается в планктоне Севастопольской бухты с октября 2005 г. и является доминирующим [3, Алтухов, Губанова, 2006; 23,

[Загородняя, 2002]. Среди причин, обусловивших успешность его инвазии в Чёрное море, – толерантность к изменениям солёности и температуры [94, Gubanova, Altukhov, 2007]. Поскольку *O. davisae* достигает наибольшей численности в загрязнённых водах бухты, мы предположили, что данный вид толерантен и к другим неблагоприятным условиям среды (в частности, к загрязнению) и определяли для него ДЖО отдельно.

Выбор станций основан на опубликованных ранее гидрохимических данных по загрязнению грунтов и вод Севастопольской бухты и открытого побережья биогенными элементами, нефтепродуктами и тяжёлыми металлами [6, Овсяный и др., 2000; 7, Иванов и др., 2006; 39, Копытов и др., 2010]. В соответствии с результатами, представленными в [39, Копытов и др., 2010], индекс суммарного загрязнения донных осадков центральной части бухты (ст. 3), как минимум, в пять раз превышает таковой на внешнем рейде в миле от бухты. По содержанию нефтепродуктов эта разница ещё более выражена и составляет несколько порядков величин. Имеющиеся гидрохимические данные дают достаточно оснований для того, чтобы считать корректным рассмотрение биологических переменных, измеренных на ст. 1 и 3, в аспекте сравнения морских акваторий, подверженных слабой и сильной антропогенной нагрузке.

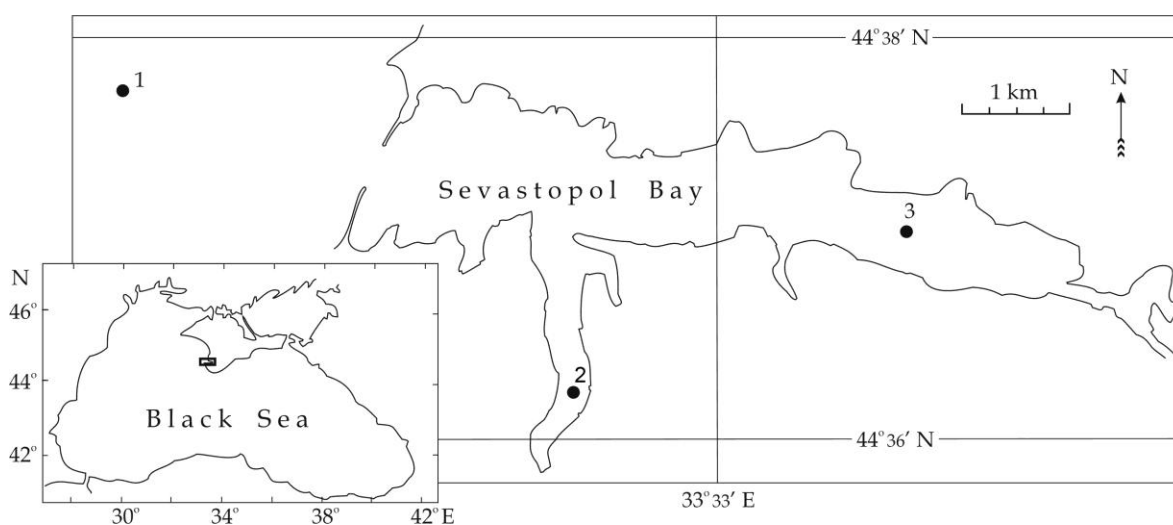


Рис. 2.1. Схема расположения станций отбора зоопланктонных проб

2.2. Культура копеподы *Calanipeda aquaedulcis*

Отсутствие общепринятого метода дифференцирования живых/мёртвых организмов морского зоопланктона определило цель и основные задачи исследований. Главная цель первых экспериментов заключалась в поиске и освоении методики, подходящей для Чёрного моря. Выбор методов окраски пробы, как основного направления работы, потребовал от нас выявить красящее вещество.

2.2.1. Условия культивирования *C. aquaedulcis*.

Для отработки разных методик окраски зоопланктона новым витальным красителем – диацетатом флуоресцеина (ДФ) использовали модельную культуру типичной солоноватоводной копеподы *Calanipeda aquaedulcis* Kritchagin, 1873, семейство Pseudodiaptomidae (рис. 2.2), которую любезно предоставляли сотрудники лаборатории культивирования камбалы калкан (Аганесова Л.О., Ельников Д.А.). Преимущества работы с этим видом в лабораторных условиях заключаются в относительно крупных размерах (до 1,3 мм), активном движении, а также неприхотливости (аутоингибирование, толерантность к условиям содержания) вида к неблагоприятным условиям содержания (недостаток пищи, качество воды).

Культивирование копепод *C. aquaedulcis* производили при температуре $21 \pm 4,5^{\circ}\text{C}$ и плотности *организмов* в сосудах от 3 до 5 экз/мл. В качестве корма для копепод использовали смесь микроводорослей Bacillariophyceae: *Phaeodactylum tricornutum*; Chlorophyceae: *Chlorella vulgaris* и *Dunaliella salina*; Dinophyceae: *Prorocentrum cordata*, *Prorocentrum micans*; Prymnesiophyceae: *Isochrysis galbana*; концентрацию пищи поддерживали *ad libitum*.

Для культивирования были использованы экспериментальные сосуды цилиндрической формы объемом 40 л., которые находились в условиях

круглосуточного и естественного освещения. Кормление копепод осуществляли 2 – 3 раза в неделю, смену воды производили 1 – 2 раза в 14 дней.

Для экспериментов использовали профильтрованную морскую воду, прошедшую механическую фильтрацию через картриджные фильтры (10, 5 и 1 мкм) и обработанную ультрафиолетом.

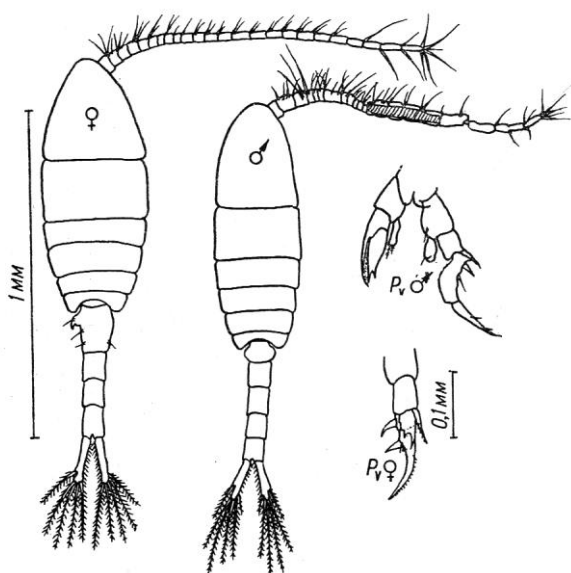


Рис. 2.2. Схематичное изображение *Calanipeda aquaedulcis* [47]

2.2.2. Контроль соотношения живых/мёртвых в эксперименте.

Необходимость использовать в экспериментах гарантированно «мёртвые» организмы для оценки эффективности витального красителя требовала выбора оптимального способа умерщвления живых *C. aquaedulcis*. Для этого сравнивали разные методы: гипоксийный и тепловой шок, пары и фиксация формалином, заморозку.

Гипоксийную среду создавали путём откачивания воздуха из ёмкости с пробой (10 – 15 мин.) с помощью вакуумного насоса. В течение 2-3 часов организмы сохраняли движение.

Культуру в чашке Петри помещали под стеклянный колпак вместе с кусками ваты, обильно смоченными формальдегидом. Смерть всех особей

наступала спустя 2,5 – 3 часа. Добавление формалина (конечная концентрация 2%) непосредственно в пробу с культурой приводило практически к мгновенной гибели младших копеподитов, а затем и половозрелых калянипед.

Тепловое воздействие на культуру оказывали двумя способами: нагреванием пробы на водяной бане до температуры 50 – 58°C в течение 7 – 10 мин., и на электроплитке (до 50°C) в течение 5 – 7 мин. По окончании нагревания в колбе или стаканчике с пробой образовывался густой осадок из погибших организмов.

Из всех использованных способов умерщвления *C. aquaeduicis* наиболее удобным, быстрым и эффективным был признан тепловой шок и фиксация формалином.

Полученные результаты подтверждены литературными данными. Например, для экспериментов с копеподами, собранными в Чесапикском заливе в июне – июле 2005 г., использовали 4% формальдегид в течение 5, 15 и 20 минутной экспозиции [118, *Tang et al.*, 2006], как и [89, *Farran*, 1926]. Циклопов (*Cyclops vicinus*) и дафний (*Daphnia* группы *longispina*) разного размера и стадий убивали нагреванием до 45 – 55°C и окрашивали только спустя 1,5 – 3 часа после гибели [19, *Дубовская*, 2008]. Нагревание (высокую температуру) использовали также в работах [81, *Crippen, Perrier*, 1974, 83, *Dressel et al.*, 1972]. Известны также способы умерщвления планктона, которые не вызывают видимых изменений внутренних органов и структуры организмов, такие как дефицит растворённого в воде кислорода, электрический ток и уретан [29, *Зелезинская*, 1966].

2.3. Подготовка к анализу

Долю живых копепод (и организмов других таксонов) в пробах зоопланктона определяли методами окраски витальными красителями: нейтральным красным (НК) и диацетатом флуоресцеина (ДФ).

Свежесобранную пробу транспортировали в лабораторию ИнБЮМ в течение короткого времени (от 45 мин. до 2 ч.) в условиях, максимально приближенных к естественным (температура *in situ*, темнота). В лаборатории её делили на условно равные части в специальном разделителе планктона, сконструированном Мотодой (рис. 2.3) [36, Киселёв, 1969], по схеме (рис. 2.4). Первую часть пробы фиксировали формальдегидом с конечной концентрацией 2 – 4%. Вторую – повторно делили и параллельно окрашивали НК и ДФ согласно протоколам, описанным ниже. После окраски и промывания организмов фильтрованной морской водой объёмы субпроб, окрашенных НК и ДФ, были одинаковы. Из них отбирали аликвоты с помощью штемпель-пипеток (объём 1, 2 и 5 мл) для последующего анализа. Независимо от метода подготовки проб в каждой из них анализировали от 200 до 800 особей.

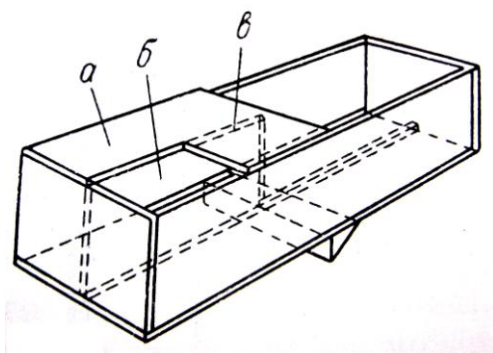


Рис. 2.3. Ящик Мотоды для разделения пробы планктона: а – крышка, б – угловое отверстие, в – перегородка [по Motoda, 1959] [36, Киселёв, 1969]

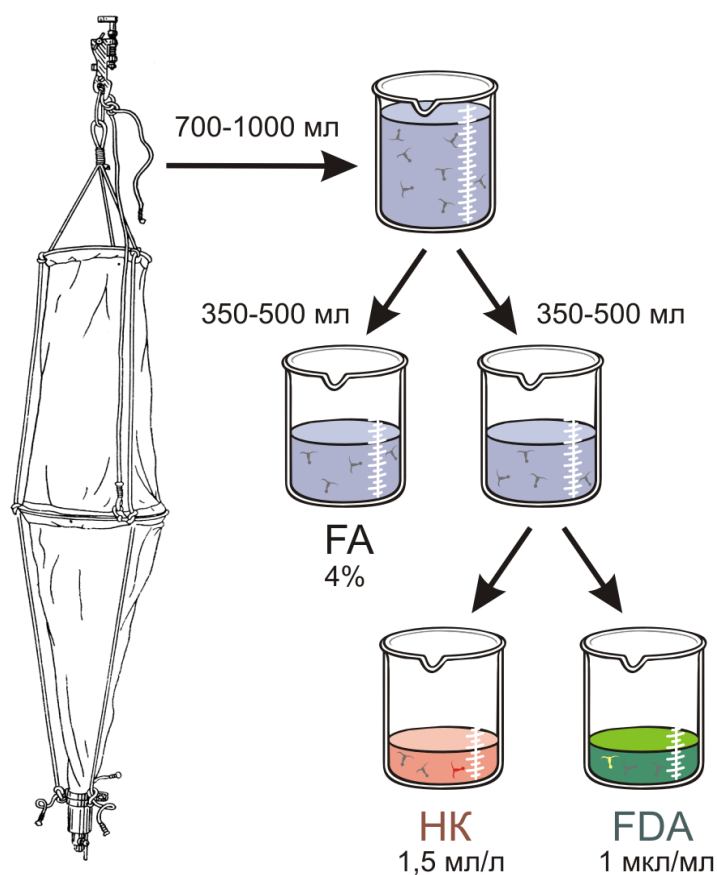


Рис. 2.4. Схема деления и окраски культуры и проб природного зоопланктона

2.4. Окраска нейтральным красным (НК)

Нейтральный красный (НК) – витальный краситель, традиционно применяемый для дифференцирования живых/мёртвых копепод (Calanoida, Copepoda) в соответствии со стандартным методом [83, Дрессел, 1972] и его некоторыми модификациями и дополнениями [86, 85, Elliott, 2009, 2011, 118 - 116, Tang].

Окраску проб НК проводили 1%-ным раствором, добавляя 1,5 мл на каждые 1000 мл пробы, конечная концентрация красителя составляла 1:67000. Время экспозиции составляло от 15 мин до 4 часов, при этом низкая концентрация НК позволяла копеподам сохранять двигательную

активность. По истечении времени окраски пробу концентрировали на 60-мкм газ планктонного стаканчика и промывали морской воды, профильтрованной через газ $<0,3 - 3$ мкм, для удаления с поверхности животных излишков красителя. Затем окрашенных и промытых организмов смывали с газа в фильтрат и доводили до необходимого объёма. Из этого объёма отбирали субпробы минимум в двух повторностях для дальнейшего подсчёта под микроскопом и анализа степени окрашенности.

2.5. Окрашивание диацетатом флуоресцеина (ДФ)

Рабочий раствор ДФ готовили в диметилсульфоксиде (5 мг мл^{-1}) и хранили при $+4^\circ\text{C}$. Окрашивание ДФ проводили из расчёта 1 мкл раствора ДФ на 1 мл пробы в соответствии с методом, широко применяемым в исследованиях морского фитопланктона [123, *Brookes, 2000*]. Краситель добавляли по частям малыми порциями при интенсивном встряхивании колбы с пробой. Далее пробу инкубировали в темноте в течение 40 мин (иногда до 2 часов), концентрировали и промывали по методу, описанному для НК.

2.6. Световая и флуоресцентная микроскопия окрашенных и неокрашенных проб культуры *C. aquaeduicis* и морского зоопланктона

Обработку материала и микрофотосъёмку организмов проводили в камере Богорова под микроскопом Nikon Eclipse TS100-F, оборудованного фото- и видеокамерой Ikegami ICD-848P, при увеличении $4\times$, $10\times$, $40\times$ в световом (светлое и тёмное поле для НК) и люминесцентном режимах (набор светофильтров для возбуждения в синей области спектра для ДФ). Использование инвертированного микроскопа потребовало изготовления специальной камеры (по принципу устройства камеры Богорова) с дном из

тонкого стекла. Подобная камера позволила получать качественные фотоснимки окрашенных НК зоопланктёров в режиме тёмного поля.

2.7. Визуальный метод определения мёртвых организмов в пробе

Как показано в работах отечественных [5, *Гептнер и др.*, 1990; 26, *Зелезинская*, 1965; 37, *Коваль*, 1984; 54, *Петина*, 1995; 51, *Павлова, Мельникова*, 2011; 131, *Svetlichny et al.*, 2006] и зарубежных авторов [124, *Weikert*, 1977; 127, *Wheeler*, 1967], оценка состояния зоопланктёров в фиксированных пробах предполагает визуальный анализ сохранности тел и внешних покровов для вывода о том, был ли организм до фиксации живым или мёртвым.

В настоящей работе, наряду с окраской, мы использовали визуальный метод дифференцирования живых/мёртвых организмов. Каждую особь отдельно просматривали под большим увеличением, внимательно изучая целостность хитинового покрова, состояние тканей и мышечных волокон – как в дорсальной, так и в латеральной проекции. Особое внимание уделяли наличию просветов в цефалоне, антеннах, абдомене копепод, а также отслоению карапакса от внутренних органов. Опираясь на наличие или отсутствие признаков разложения, все исследованные объекты относили к группе живых (L) или мёртвых (D). Долю живых особей получали как процент живых от общего числа исследованных копепод. При подсчёте не учитывали пустые, полупрозрачные организмы, без сохранённых внутренних структур, предполагая, что это либо экзувии (шкурки членистоногих после линьки), либо очень старые трупы, поднимаемые со дна (например, на ст. 2, 3, где максимальная глубина до 6 – 10 м).

2.8. Оцифровка изображений организмов

2.8.1. Микрофотографирование организмов.

Микрофотосъёмка окрашенных организмов проводилась цифровой фотокамерой Ikegami ICD-848P в цветном режиме. Автоматический режим камеры (автоматический выбор экспозиции) не использовали, так как если в поле зрения попадают только яркие (например, живые организмы, окрашенные ДФ) или только тёмные объекты (например, близкие по яркости к темному фону мёртвые организмы), то автокоррекция изображений, производимая фотокамерой, искажала цветовые и яркостные (контраст объекта с фоном) характеристики объектов, и, как следствие этого, сопоставление таких изображений было невозможным. Настройки фотокамеры выбирали в ручном режиме таким образом, чтобы избежать, во-первых, пересветов на наиболее ярких объектах (то есть потери информации о яркости и цвете) и, во-вторых, сливания объектов с фоном (например, неокрашенные объекты на тёмном поле люминесцентного микроскопа), и сохраняли эти настройки неизменными в течение фотосъёмки, по крайней мере, одной пробы. Это было гарантией того, что изображения как живых, так и мёртвых организмов одной и той же пробы были получены в одинаковых условиях и, следовательно, могли быть использованы для дальнейшего анализа. Чем реже приходилось изменять настройки фотокамеры, адаптируя их к каждому конкретному красителю, виду организмов или серии проб, тем выше была достоверность получаемых результатов.

2.8.2. Измерение цветовых характеристик организмов.

В качестве программного обеспечения для дальнейшей работы с изображениями применяли редактор растровой графики, который позволяет определять основные цветовые и яркостные характеристики любого из

пикселей изображения в соответствии с тремя цветовыми моделями: HSB (H – цветовой тон, S – насыщенность, B – яркость), RGB (R – красный, G – зелёный, B – синий) и CMYK (C – циановый, M – пурпурный, Y – жёлтый, K – черный). Переменная Hue изменяется в диапазоне от 0° до 360° (непрерывный цветовой спектр), остальные переменные – от 0 до 255. Первоначально мы использовали Adobe Photoshop для оцифровки изображений, вручную данные по цветовым моделям для каждой особи заносились в таблицу Microsoft Excel, а последующее построение графиков осуществлялось в Grapher. Этот алгоритм требовал затрат большого количества времени и сил. Для упрощения работы и решения поставленных задач аспирантом отдела функционирования морских экосистем ИнБЮМ В.С. Дзицким написана компьютерная программа ImageRegionColor (IRC) [13, *Дзицкий, 2011*]. Она является приложением к ОС Windows 98/XP и обеспечивает работу с данными в формате *.bmp, *.jpg. Программа IRC позволила автоматизировать процесс усреднения цвета выделенного цветового пятна и занесения цветовых характеристик в таблицу, что позволило в короткое время обрабатывать большое количество фотоизображений. При завершении работы с программой данные выходной таблицы могут быть сохранены для дальнейшей обработки в формате электронных таблиц с разрешением файлов *.txt или *.xls. [14, *Дзицкий, 2011*] (рис. 2.5).

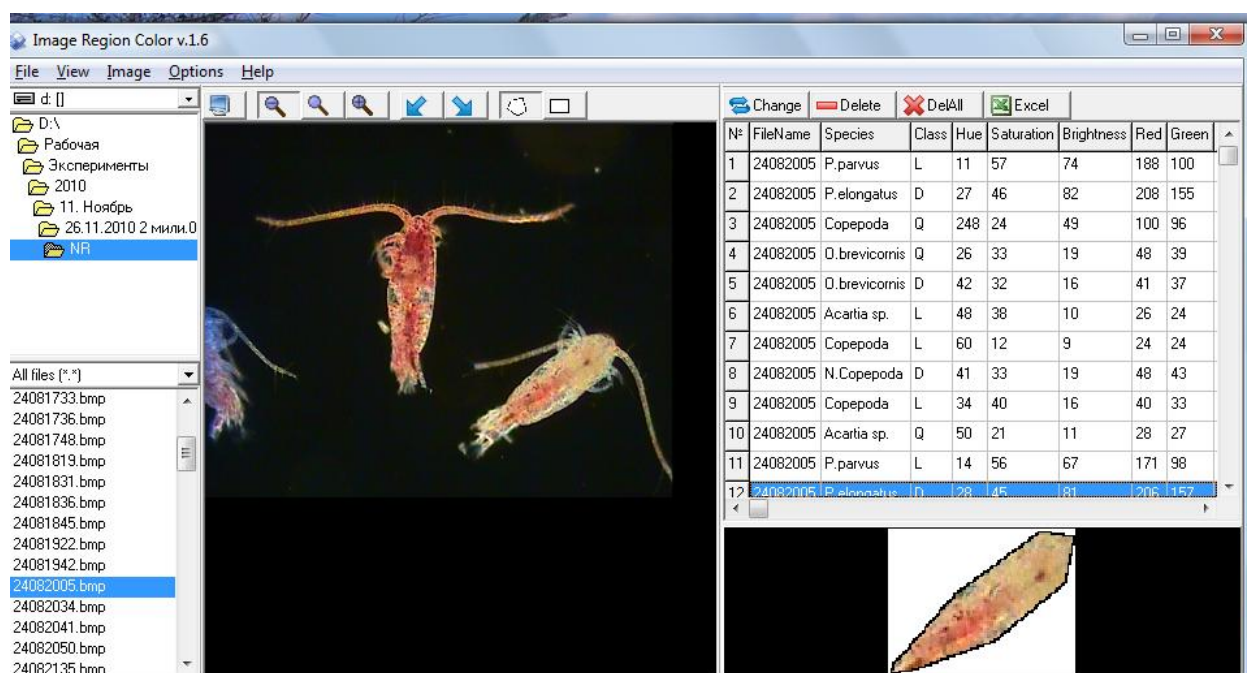


Рис. 2.5. Интерфейс компьютерной программы ImageRegionColor v.1.6.

Для каждой анализируемой особи получали один набор значений характеристик HSB, поэтому важное значение имели локализация и способ отбора пробы цвета в пределах границ изображения организма. Отбор производился в зонах с наибольшей интенсивностью окраски (например, у копепод, окрашенных ДФ или НК, это цефалоторакс (рис. 2.6, А и В). У неокрашенных организмов использовали ту же зону (рис. 2.6, Б и Г). Если изображение интересующей области было неоднородно по цвету и яркости, имело пятна и/или зернистость (как, например, это часто бывает у копепод, см. рис. 2.6, В), сначала выделяли всю окрашенную область (инструмент «лассо», Lasso Tool, в Adobe Photoshop), осредняли её яркостные и цветовые характеристики, а потом уже производили их измерение. Процедура осреднения была унифицирована для анализа всей пробы. В Adobe Photoshop она выполнялась с помощью фильтра «Среднее размытие» (меню Filter > Blur > Average, рис. 2.7.), а измерение цветовых характеристик проводилось с помощью инструмента «Пипетка» (Eyedropper Tool, рис. 2.7., справа).

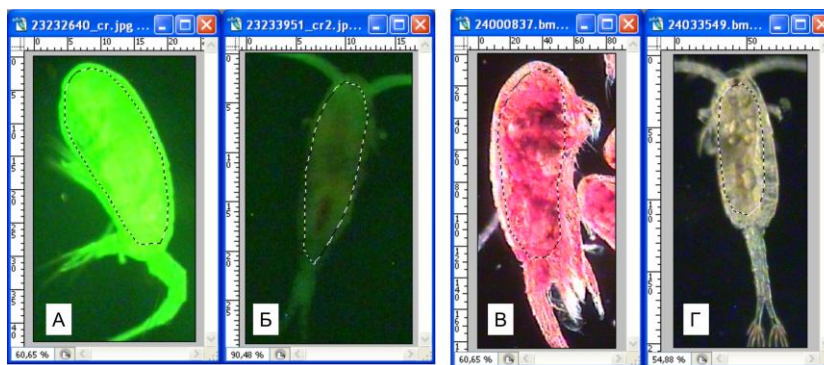


Рис. 2.6. Пример выделения области интенсивной окраски *C. aquaedulcis*, окрашенных ДФ (А – живая особь, Б – мёртвая) и НК (В – живая, Г – мёртвая) в Adobe Photoshop. Пунктиром выделен цефалоторакс

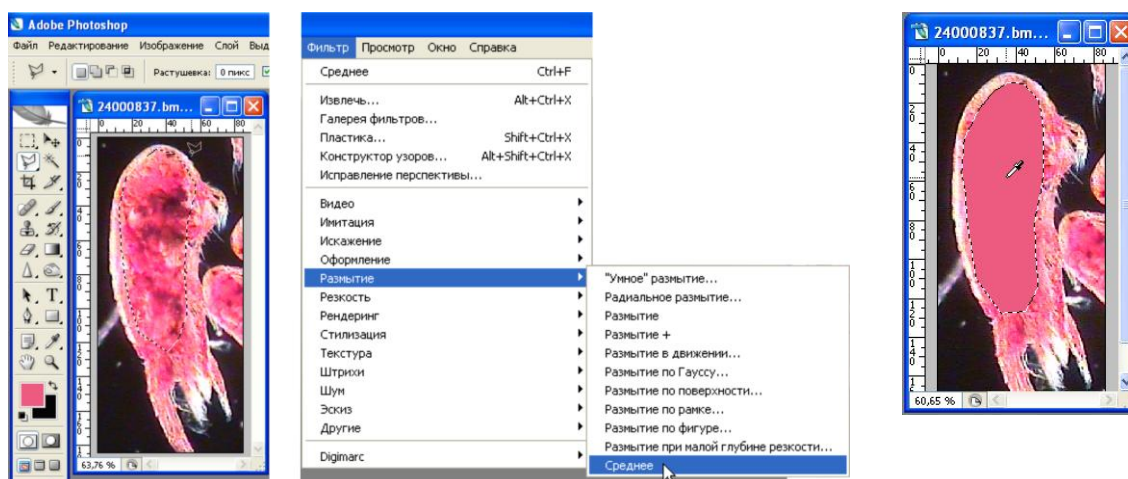


Рис. 2.7. Использование инструмента «Прямоугольное лассо» (слева) и фильтра «Среднее размытие» (в центре) в редакторе Adobe Photoshop CS2 для выделения зоны цефалоторакса и осреднения её цветовых характеристик. Результат применения фильтра показан справа

2.9. Классификация организмов по их цветовым характеристикам

По завершении измерений цветовых характеристик у всех особей в пробе (рис. 2.8.) полученные цифровые данные сводили в таблицу, в которой каждая строка соответствовала одной особи, количество строк было равно количеству особей. Каждая особь, отнесенная к одному из

классов L, D или Q (категориальная переменная CLASS), характеризовалась цветовыми переменными моделей RGB и HSB. Для работы с каждым конкретным красителем, как правило, требовался небольшой набор переменных. Например, при окраске зоопланктона красителем ДФ, имеющим флуоресценцию зеленого цвета, было достаточно измерить насыщенность и яркость (соответственно, S и V из HSB). Уменьшение размерности данных (то есть количество анализируемых переменных) проводили с учетом того, какие именно переменные позволяли наиболее эффективно выявлять классы живых и мёртвых организмов. На 2-параметрических диаграммах последние выглядели как хорошо отличимые кластеры точек (рис. 2.9, А). Если кластеры L и D не могли быть выявлены ни на одной из диаграмм и, как следствие этого, выбор переменных, значение которых велико для классификации организмов, был затруднён, уменьшение размерности данных производили с помощью дискриминантного анализа (см. ниже).

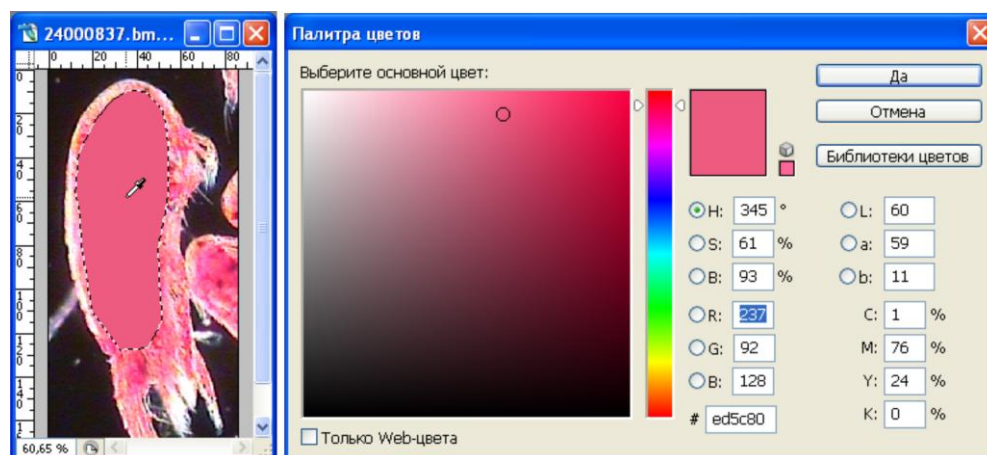


Рис. 2.8. Измерение осредненных характеристик копеподы (*C. aquaedulcis*), окрашенной НК, с применением палитры цветов Adobe Photoshop CS2

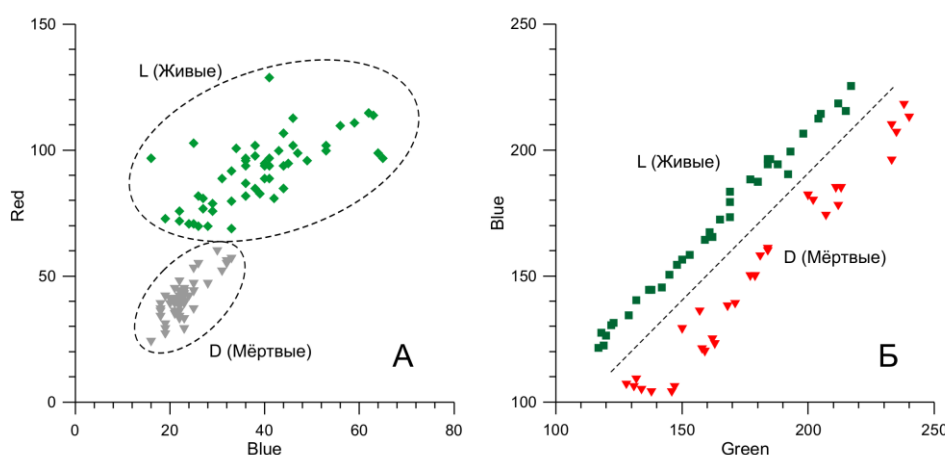


Рис 2.9. Кластеры живых и мёртвых организмов после их окраски ДФ (А) и НК (Б). Данные получены для живой и убитой температурным шоком культуры копепода (*C. aquaedulcis*)

Классификация организмов со слабо выраженной окраской. В природных пробах обычно присутствует большое число организмов, интенсивность окраски которых невелика (класс *Q*), и которые трудно отнести к живым или мёртвым с помощью визуального анализа. На диаграммах они образуют облако точек, которое накладывается на кластеры *L* и *D*, что затрудняет выбор цветовых переменных, которые бы обеспечили объективную и достоверную классификацию. Для решения обеих проблем было предложено использовать дискриминантный анализ – эффективный метод построения классификации с помощью обучающей выборки. Последняя должна включать организмы, которые были без затруднений отнесены исследователем к классам *L* и *D* в ходе микроскопирования пробы. В сводной таблице данных информация о принадлежности организма к тому или иному классу содержалась в категориальной переменной *CLASS*. В дискриминантном анализе её использовали в качестве группирующей зависимой переменной (grouping dependent variable), а цветовые характеристики (*Hue*, *Saturation*, *Brightness*, *Red*, *Green* и др.), измеренные в метрической шкале, считали независимыми переменными (independent variables). Уменьшение размерности данных проводили в пошаговом анализе дискриминантных функций. На каждом

шаге просматривали все независимые переменные, и находили ту из них, которая вносила наибольший вклад в различие между классами. Модель дискриминантного анализа, которая строилась на основе обучающей выборки, позволяла установить с определённой достоверностью принадлежность организмов со спорной окраской (класс Q) к классам L или D [68, Муханов, Литвинюк, 2010].

2.10. Алгоритм оценки ДЖО в окрашенных пробах зоопланктона

1. Отбор пробы мезозоопланктона и её окраска для идентификации живых/мёртвых организмов осуществлялись в соответствии с методами, предусмотренными для этих целей (см. выше).

2. Исследование репрезентативной выборки организмов под микроскопом:

а) отнесение каждой из особей к одному из трёх классов по визуальным признакам (интенсивности окраски):

- «Живые» (L);
- «Мёртвые» (D);
- «Сомнительные» (Q).

Визуальная оценка интенсивности окраски особей производилась в поле зрения микроскопа в соответствии с методикой применения красителя. Каждую особь относили к одному из двух классов – «Живые» (L) или «Мёртвые» (D). Если это затруднительно или невозможно, особь относили к классу «Сомнительные» (Q).

б) получение цифровых изображений каждой из особей с помощью микрофотографирования.

3. Измерение средних для каждой особи цветовых и яркостных характеристик (цветовые модели HSB, RGB, CMYK, LAB) в графическом редакторе.

4. Сведение полученных данных в таблицу в формате, пригодном для дискриминантного анализа.

5. Применение дискриминантного анализа для:

а) уменьшения размерности данных (пошаговый анализ с включением переменных);

б) построения классификации объектов, используя классы L и D в качестве обучающей выборки;

в) отнесения каждого из организмов класса Q к классам L или D в соответствии с дискриминантной моделью [68, Муханов, Литвинюк, 2010].

2.11. Схемы экспериментов

2.11.1. Определение ДЖО в культуре копеподы *C. aquaedulcis* после окраски НК и ДФ (Эксперимент I).

Использовали культуру *C. aquaedulcis* в активной фазе роста. Для упрощения анализа выделяли три размерные группы организмов: науплии, копеподиты и половозрелые особи (их приблизительное соотношение в культуре было 2:2:1).

Эксперименты проводили с живыми и умерщвленными тепловым шоком (60°C в течение 10 мин) или фиксацией формалином (конечная концентрация 2 %) организмами. Каждым из красителей окрашивали живую и две мёртвых пробы (убитые температурой и формалином), пробы концентрировали в планктонный стаканчик (60 мкм), затем организмы отмывали от красителя фильтратом (<0,2 мкм) морской воды. Поскольку в живых пробах окрашенные копеподы продолжали активное движение (т.е. окрашивание не оказывало заметного влияния на их физиологическое состояние), пробы фиксировали формалином перед их исследованием под микроскопом.

Окраску НК и ДФ проводили в соответствии с протоколом, описанным выше. Интенсивность окраски особей трёх групп определяли визуально, производя при этом их фотографирование. Проведено 2 комплексных эксперимента, в каждом из которых живые и мёртвые пробы окрашивали с помощью обоих красителей. Всего исследовано 565 организмов и получены их фотографии в световом и люминесцентном режимах. Эффективность визуальной идентификации живых организмов в пробах, окрашенных ДФ, оценивали следующим образом. Из всей базы фотоснимков копепод, окрашенных ДФ (440 экз.), делали их случайную выборку с заданным соотношением живых и заведомо мёртвых организмов. Затем производили визуальную идентификацию живых особей и определяли их долю в этой смешанной выборке (не менее 150 снимков в каждой из 3-х повторностей). Полученную среднюю ($\pm 95\%$ дов. интерв.) сравнивали с изначально задаваемым соотношением живых и мёртвых особей. Расчеты производили в программе Grapher 2.0.

2.11.2. Сравнение визуального метода определения ДЖО с методами окраски красителями (Эксперимент II).

Для сопоставления данных о ДЖО, полученных методами окраски ДФ и НК, с визуальным методом идентификации живых организмов, пробы, отобранные на ст. 1 («2 мили») в апреле, июне и августе 2011 г., дополнительно делили по схеме, описанной выше (см. п. 2.3., рис. 2.4). Во всей серии экспериментов наличие/отсутствие признаков разложения определяли визуально у более чем 700 копепод, оценивали ДЖО и сравнивали результаты с данными, полученными для тех же проб с помощью ДФ и НК – 325 и 338 экз., соответственно (см. табл. 2.2).

2.11.3. Метод сохранения окраски НК в щелочной среде (Эксперимент III).

С целью сохранения окраски НК в организмах зоопланктёров на срок от 1 суток и более применяли метод хранения пробы в щелочном фильтрате морской воды с последующим восстановлением цвета кислотой [86, *Elliott, Tang, 2009*; 90, *Fleming, Coughlan, 1978*; 118, *Tang et al., 2006*]. Апробацию метода проводили на культуре *C. aquaeduicis* и естественном сообществе черноморского планктона (б. Южная, май 2010 г. – 0-3 м, июнь 2010 г. – 0-6 м).

Окрашенную НК пробу концентрировали на 60-мкм газ планктонного стаканчика, промывали морской фильтрованной водой ($<0,2$ мкм) и смывали с газа планктонного стакана щелочным раствором (NaOH) морской воды ($pH > 8$). Затем добавляли формальдегид (конечная концентрация 2-4%) и помещали в холодильную камеру ($4^{\circ}C$). После выполнения этой процедуры происходило обесцвечивание организмов. По [90, *Fleming, Coughlan, 1978*] щелочная среда помогает сохранить краситель в тканях зоопланктонных организмов длительное время. Для восстановления цвета непосредственно перед анализом пробы добавляли раствор соляной кислоты (1 мл 1М раствора HCl на каждые 10 мл пробы) ($pH < 7$). Основной анилиновый краситель в кислой среде имеет ярко-красный цвет, а в щелочной – жёлтый. На этом свойстве маркера построена идея подкисления окрашенной пробы.

Стандартно окрашенную (на 100 мл пробы – 150 мкл НК) свежую культуру делили на три условно равные части. Первую из них анализировали сразу после окраски (без подщелачивания среды) и принимали за контроль (**K**) (несколько капель FA добавляли для обездвиживания животных). Вторую – в этот же день (без хранения) перемещали в щелочной фильтрат морской воды и подкисляли для восстановления цвета (**AI**). Третью – хранили в щелочном растворе

морской воды в холодильной камере (+4°C) в течение нескольких (1, 2, 3, 7 и 11) суток и подкисляли непосредственно перед обработкой пробы (A2).

В ходе анализа в пробах оценивали количество хорошо окрашенных (L), неокрашенных (D) и слабо окрашенных (Q) организмов. Для классификации «спорных» организмов (Q) на живые или мертвые в культуре и нативных пробах применяли дискриминантный анализ (ДА).

Недостаточное количество *Copepoda* в природных пробах не позволило анализировать окраску веслоногих ракообразных. Единственной многочисленной группой окрашенного планктона, пригодной для оценки сохранения цвета, послужили науплии усоногих ракообразных – *Cirripedia*.

2.11.4. Метод заморозки пробы, окрашенной НК, на фильтре (Эксперимент IV).

Для хранения проб зоопланктона использовали метод заморозки окрашенных организмов в «сухом» виде на фильтрах, предложенный американскими исследователями – Д. Эллиотом и К. Тангом (David T. Elliott и Kam W. Tang) в 2009 г. [86, *Elliott, Tang, 2009*]. Пробы зоопланктона отбирали на ст. 1 («2 мили») и ст. 3 («Сухарная балка») в июле-сентябре 2011 г., а также в ходе 70 рейса НИС «Профессор Водяницкий» в августе 2011 г.

Окрашенную НК пробу с помощью пластиковой воронки типа «Sartorius» (объемом 250 мл) процеживали через фильтр (nylon mesh disk), изготовленный из планктонного газа с размером ячеек 100 мкм. Фильтр с осевшим на нём зоопланктоном перекладывали в чашку Петри и убирали в морозильную камеру (>-20°C) для быстрой заморозки и хранения в темноте. Непосредственно перед анализом пробы организмы смывали с фильтра холодной морской фильтрованной водой (0,3 – 3 мкм) в планктонный стакан. Для восстановления цвета пробу подкисляли (pH<7), как описано выше (см. п. 2.11.3).

При обработке материала каждый объект фотографировали отдельно. Массив фотоизображений, полученный при отработке методик сохранения НК, подвергали оцифровке и, при необходимости, использовали дискриминантный анализ. В экспериментах на пробах природного зоопланктонного сообщества оценивали степень восстановления окраски при разных сроках хранения материала и темпы снижения величин ДЖО при увеличении продолжительности хранения.

2.11.5. Метод заморозки организмов в жидкой пробе после окраски ДФ (Эксперимент V).

Диацетат флуоресцеина использован нами впервые в качестве маркера жизнеспособности организмов зоопланктона. По этой причине необходимо было разработать методики сохранения окраски организмов при хранении в течение длительного времени. Сохранять флуоресценцию ДФ в телах зоопланктёров в условиях низких температур представлялось наиболее целесообразным.

Методику апробировали на естественном сообществе зоопланктона из Сухарной балки (глубина отбора – 0-10 м) в марте 2010 г. Пробу окрашивали по стандартному протоколу (на 1 мл пробы – 1 мкл ДФ), делили её для получения контрольных образцов без заморозки (контроль) и образцов, сохранённых в условиях заморозки. Замораживали окрашенные аликвоты следующим образом: А – «простая» заморозка при температуре -15°C, Б – с добавлением FA в конечной концентрации 4%, В – с добавлением FA (4%) и раствора криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО) с расчётом 1/20 (то есть на 50 мл пробы – 2,5 мл ДМСО), Г – с добавлением только ДМСО.

2.11.6. Метод заморозки организмов, окрашенных ДФ, на фильтре (Эксперимент VI).

Удачные результаты по заморозке на фильтре и сохранению окрашенных НК *Copepoda* дали все основания предположить, что и флуоресценцию ДФ можно сохранять подобным способом. Апробацию подхода проводили на культуре копепода *C. aquaeduicis*. Окрашивали по стандартному протоколу, на 1 мл пробы – 1 мкл ДФ, в течение 40-50 мин. Пробу процеживали через фильтр (100 мкм планктонный газ), который перекладывали в чашку Петри и замораживали при температуре $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Спустя 1 сутки с момента заморозки пробу смывали с фильтра холодным фильтратом морской воды (0,3 мкм), каланипед фотографировали и подсчитывали в камере Богорова. Затем пробу произвольно делили для последующего анализа (на 8 и 16 сутки) и повторно замораживали. В каждой повторности визуально оценивали интенсивность окраски и относили исследуемые объекты к классам L, D или Q. Для объективного дифференцирования окрашенных животных на классы живых и мёртвых применяли ДА.

2.11.7. Одновременное окрашивание культуры копепод с помощью НК и ДФ (Эксперимент VII).

Предположение, что применяемые нами красители могут использоваться для одновременной окраски одной и той же пробы, было основано на различиях в механизмах их действия и режимах микроскопирования. Как уже упоминалось, ДФ окрашивает ферменты группы эстераз, а НК – лизосомы жизнеспособных клеток. Для визуализации организмов, окрашенных ДВ, используется люминесцентный режим, для НК – световой режим (светлое и тёмное поле). Таким образом, при одновременном (совместном) использовании маркеров «двойное»

окрашивание одной и той же особи могло дать полезную информацию об особенностях каждого из маркеров в фиксации момента смерти этой особи. Для проверки этой гипотезы использовали модельную культуру *C. aquaeduicis*. Учитывая разницу в продолжительности окраски, начинали с ДФ, так как продолжительность экспозиции этого красителя составляет 40 мин., а у НК – 15 мин. В некоторых экспериментах последовательность меняли. То есть, проба сначала выдерживалась в одном красителе, а затем добавляли другой. Чтобы оценить эффективность действия НК и ДФ, анализировали вклад цветовых компонент в окраску каланипед.

2.11.8. Усовершенствованная процедура классификации организмов зоопланктона на живые и мёртвые после их окраски витальными красителями (Эксперимент VIII).

Апробацию усовершенствованного метода проводили на пробах черноморского мезозоопланктона (все этапы – от сбора материала до статистического анализа данных) и модельной культуре *Calanipeda aquaedulcis* (от обработки микрофотографий до анализа данных). Цифровые изображения копепод *C. aquaedulcis*, полученные ранее в экспериментах с заведомо мёртвой/живой культурой (см. раздел 2.11.2), использовали для измерения цветовых переменных отдельных особей и графического представления полученных данных.

Пробы зоопланктона отбирали в прибрежных водах на траверзе р. Бельбек (март 2010 г., 0 – 20 м, окраска НК) и бухте Южная (июнь 2010 г., 0 – 6 м, окраска ДФ). Пробы окрашивали на борту судна сразу после отбора и сохраняли в проточной забортной воде до прибытия в лабораторию. Организмы отмывали от красителей фильтратом (<0,3 мкм) морской воды, взятой одновременно с отбором проб. Интенсивность окраски измеряли только у копепод (копеподиты и половозрелые особи).

Всего исследовано 173 каланипеды из культуры (науплии, копеподитные стадии и половозрелые особи) и 176 экз. массовых видов

копепод (науплии не включены) – из зоопланктонных проб, и получены их фотографии в световом и люминесцентном режимах. В ходе фотосъемки пробы мезозоопланктона, окрашенной ДФ, были изменены условия освещения в лаборатории (включены дополнительные лампы накаливания) для того, чтобы выяснить, как это отразится на результатах анализа.

Дискриминантный анализ применяли также для того, чтобы выяснить, отличаются ли разные стадии развития *C. aquaedulcis* по своим цветовым характеристикам, иными словами – какие цветовые переменные и в какой степени позволяют различать возрастные категории N (науплии), C (копеподиты) и A (половозрелые особи) в культуре копепод.

2.11.9. Соотношение живой и мёртвой компонент сообщества зоопланктона в водах с разным гидролого-гидрохимическим режимом (Эксперимент IX).

Цель эксперимента заключалась в том, чтобы сравнить скорости разложения мертвых копепод (из одной и той же культуры *C. aquaedulcis*) в морской воде, отобранной на ст. 1 «2 мили» и ст. 3 «Сухарная балка». В пробах с каждой станции определяли начальные численности бактерий. Эксперимент проводили с организмами, умерщвлёнными тепловым шоком при температуре 80 – 85 °С в течение 10 мин. Для последующего анализа признаков разложения в каждой из повторностей фотографировали от 16 до 25 мёртвых особей разных стадий развития (науплии, копеподиты, половозрелые особи). Затем сконцентрированных на фильтре (100 мкм) сухим остатком *C. aquaedulcis* переместили в морскую воду со станций №№ 1, 3 и поместили на экспозицию *in situ* в Артиллерийскую бухту на глубину около 2 м. Пробы экспонировали в течение 4 суток, по истечению которых из каждой отобрали и сфотографировали более 130 трупов.

Степень разрушения особей анализировали по их фотоизображениям, визуально оценивая цвет, прозрачность, состояние тканей, внешних покровов, целостность организмов и другие признаки. Каждой исследуемой особи (кроме науплиальных стадий) присваивали степень разложения, по

убыванию от I до V: где I – практически полностью сохранённый труп, II – частично присутствуют признаки постмортального распада, в тканях и мышечных волокнах наблюдаются просветы и пустоты, III – заметны незначительные разрушения, IV – особи с сохранением внутренних органов и тканей менее чем на 50%, возможна деформация цефалоторакса, V – абсолютно пустой и прозрачный карапакс или его остатки.

2.12. Статистический анализ данных и программное обеспечение

Для переноса изображений с цифровой видеокамеры на компьютер использовали ТВ-тюнер и программу AverTV. Измерение цветовых характеристик организмов на их цифровых изображениях проводили с помощью пакета Adobe Photoshop и оригинальной программы ImageRegionColor 1.6. Дискриминантный анализ проводили в программном пакете Statistica 6.0. Для оценки достоверности отличий между выборками данных использовали *t*-критерий Стьюдента (ТТЕСТ) в программе Microsoft Excel 2003.

2.13. Количество обработанного материала

При отработке методики дифференцированного учёта живых/мёртвых представителей зоопланктона в 2009 – 2010 гг. провели 54 эксперимента на культуре копеподы (табл. 2.1) и 47 на природном сообществе зоопланктона (табл. 2.2).

Таблица 2.1.

Эксперименты по отработке методики на культуре и на естественном сообществе

№ экспер имента	Описание	Количество экспериментов	Число обработанных особей ²
-	Методические эксперименты по окраске	1	146
		3	355
I.	Определение ДЖО в культуре	2	565
II.	Сравнение методов	7	706
III.	Сохранение НК в щелочном растворе	3	164
		6	432
		6	318
IV.	Сохранение НК на фильтре	5	700
V.	Сохранение ДФ в жидкой пробе	4	474
VI.	Сохранение ДФ на фильтре	3	363
VII.	Одновременное окрашивание НК и ДФ	4	193
VIII.	Усовершенствованная процедура	1	176
		1	173

² Под обработкой понимается подсчёт, фотографирование и оцифровка каждой особи.

	классификации		
IX.	Разложение	8	307
Всего:		54	5 072

Таблица 2.2.

Объём материала для получения данных о ДЖО природного
сообщества зоопланктона

Месяц, год	Точки отбора	Колич- ество проб	Количество повторностей (число обработанных особей ³)	
			ДФ	НК
июнь 2010	б. Южная	1	-	1 (252)
август 2010	б. Южная	1	1 (226)	1 (297)
сентябрь 2010	б. Южная	1	1 (62)	1 (173)
октябрь 2010	2 мили	1	2 (142)	2 (213)
	Сухарная балка	1	1 (197)	1(178)
ноябрь 2010	2 мили	1	1 (341)	1 (96)
декабрь 2010	б. Южная	1	1 (98)	2 (118)
	2 мили	1	4 (445)	2(366)
январь 2011	2 мили	1	2 (139)	2 (103)
февраль 2011	2 мили	1	2 (254)	2 (288)
	Сухарная балка	1	4 (116)	4 (70)
март 2011	Сухарная балка	1	2 (202)	2 (184)

³ Под обработкой понимается подсчёт, фотографирование и оцифровка каждой особи.

	2 мили	1	1 (141)	2 (244)
апрель 2011	2 мили	1	2 (146)	2 (131)
	Сухарная балка	1	1 (88)	1 (158)
	2 мили	1	2(368)	2 (454)
май 2011	2 мили	1	-	2 (249)
	Сухарная балка	1	2 (175)	2 (173)
июнь 2011	2 мили	1	3 (86)	4 (107)
	Сухарная балка	1	1 (352)	2 (410)
июль 2011	2 мили	1	2 (123)	2 (103)
	2 мили	2	4 (194)	4 (207)
	Сухарная балка	1	1 (139)	1 (125)
август 2011	2 мили	2	4 (93)	4 (100)
	Сухарная балка	1	1 (194)	1 (117)
сентябрь 2011	2 мили	2	4 (177)	2 (88)
	Сухарная балка	1	1 (354)	2 (313)
октябрь 2011	2 мили	1	2 (108)	2 (128)
	Сухарная балка	1	2 (156)	2 (188)
август 2009 – октябрь 2011 ⁴	Севастопольская бухта, траверз бухт Круглая, Стрелецкая, устье р. Бельбек, 2 мили	15	(763)	(826)
Всего			54 (5879)	58 (6459)
		47 проб	12338 экз.	

⁴ Анализировали всех представителей мезозoopланктона

РАЗДЕЛ 3

НОВЫЙ МЕТОД ВИТАЛЬНОЙ ОКРАСКИ ОРГАНИЗМОВ ЗООПЛАНКТОНА ДИАЦЕТАТОМ ФЛУОРЕСЦЕИНА (ДФ): УСЛОВИЯ ОКРАСКИ И ХРАНЕНИЯ ПРОБ, СРАВНЕНИЕ С ДРУГИМИ КРАСИТЕЛЯМИ

3.1. Определение ДЖО в культуре копеподы *C. aquaedulcis* после окраски НК и ДФ (Эксперимент I)

Оба красителя, ДФ и НК, позволили качественно дифференцировать живые и мёртвые особи независимо от их возрастной стадии и пола. Внутренние структуры и поверхность тела живых копепод ярко окрашивались НК в красный цвет, что позволяло легко отличать их от мёртвых особей – неокрашенных и полупрозрачных. Живые организмы, окрашенные с помощью ДФ, флуоресцировали ярким зелёным цветом на чёрном фоне, тогда как мёртвые, как в случае умерщвления животных нагреванием, так и формалином, не были окрашены, и во флуоресцентном режиме были слабо отличимы от фона.

В некоторых случаях, однако, недостаточное (в случае с НК) или неспецифическое (в случае с ДФ) окрашивание организмов могло приводить к ошибочной идентификации. При визуальном анализе живой пробы, окрашенной НК, доля «сомнительных» особей, идентификация которых вызывала затруднение, составила 5,2%, тогда как подобные трудности не были встречены в ходе исследования мёртвых организмов (все не окрашены). Таким образом, НК была свойственна недоокраска

живых особей. Решением этой проблемы могло бы быть увеличение продолжительности окрашивания или концентрации красителя.

Трудности в идентификации живых организмов, окрашенных ДФ, были связаны с наблюдаемым в некоторых случаях слабым свечением заведомо мёртвых особей. Такая неспецифическая окраска, как мы предположили, могла быть связана с деятельностью микроорганизмов-гетеротрофов, участвующих в процессах разложения. Особи, убитые температурным шоком (18 из исследованных 120 организмов), имели тусклое, но вполне различимое свечение, хотя по силе оно и не было сравнимо с ярким свечением живых копепод. Это были преимущественно половозрелые животные. Остальные организмы были с трудом отличимы от фона. Похожий результат был получен и для проб, «убитых» формалином (61 особь со слабым свечением из 127 исследованных). В большинстве случаев подобная неспецифическая окраска мёртвых особей не вызывала затруднений в дифференцировке живых и мертвых особей из-за большой разницы в интенсивности их флуоресценции.

Результаты идентификации живых особей в случайных выборках фотоснимков представлены на рис. 3.1 (в сериях А и Б использовали снимки мёртвых копепод после теплового шока, в серии В – после фиксации формалином). При заданном соотношении количества живых и мёртвых организмов 3:1 (А), 1:1 (Б) и 2:3 (В) доли живых особей были определены, соответственно, в $74,6 \pm 5,6$, $47,9 \pm 8,9$ и $40,0 \pm 0,0\%$ (указан 95% дов. инт. Здесь и ниже, $n=3$), т.е. точность определения была высока, несмотря даже на то, что в «живых» выборках попадались мёртвые особи (те единичные экземпляры погибших организмов, которые всегда присутствовали в живой культуре). Доли «сомнительных» особей, идентификация которых могла бы вызвать затруднение вследствие их неспецифической окраски, составили, соответственно, $4,8 \pm 3,4$, $7,8 \pm 6,3$ и $5,7 \pm 5,2\%$. Несмотря на достаточно высокий процент содержания «сомнительных» особей, в большинстве случаев их идентификация была

проведена корректно, поскольку разница в силе свечения живых и мертвых особей была велика, что и определило в целом высокую точность анализа. Тем не менее следует признать, что визуальное различие живых организмов от мертвых, как и всякий подобный метод, остаётся субъективным (хоть и в очень малой степени), а, значит, может проводиться с некоторой погрешностью, которую трудно определить для метода в целом, а только лишь – для каждого конкретного исследователя. На наш взгляд, наилучший способ избежать этой неопределённости – оцифровка фотоизображений организмов и осреднение их цветовых (тоновых) и яркостных характеристик. Это позволяет перейти к статистически достоверным критериям оценки живой-мёртвый, подобным тем, которые применяются в проточной цитометрии микроорганизмов [123, *Brookes et al.*, 2000].

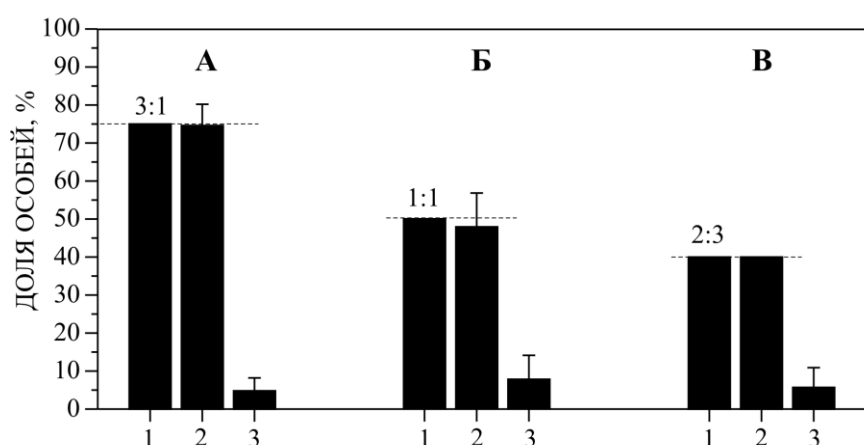


Рис. 3.1. Заданное соотношение живых и заведомо мёртвых организмов, окрашенных ДФ, в случайной выборке (1), результаты визуальной идентификации живых особей в этой выборке (2) и доля «сомнительных» особей, идентификация которых вызвала затруднение (3). Доверительный интервал рассчитан по 3-м повторностям.

3.2. Сравнение визуального метода определения ДЖО с методами окраски витальными красителями (Эксперимент II)

Во всех обработанных пробах величины ДЖО, полученные с помощью визуального метода, были выше тех, которые получали с помощью НК и ДФ, причем в большинстве случаев разница была статистически достоверна (рис. 3.2). Очевидная причина подобного завышения оценок ДЖО – трудности в визуальной идентификации ранних стадий разложения мертвых организмов и, как следствие, недоучет их количества. Методы, в основу которых положены витальные красители, лишены этого серьезного недостатка и позволяют получать более достоверные результаты.

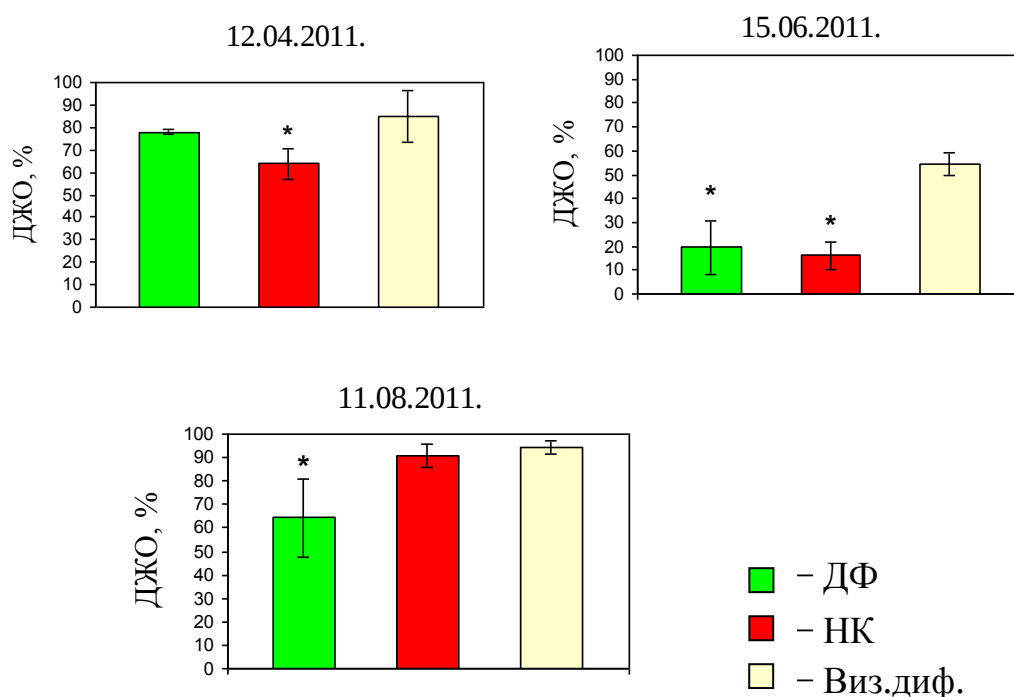


Рис. 3.2. Сравнение методов определения ДЖО по визуальным признакам (бежевые столбики) и после окрашивания витальными красителями (ДФ – зелёные столбики, НК – красные). Результаты обработки 3 проб, отобранных на ст. 1 «2 мили» в апреле, июне и августе 2011 г. Отмечены (*) статистически достоверные отличия (t -тест, $p < 0,05$) окрашенных проб от визуального метода

3.3. Сохранение пробы после окраски НК

Время нахождения маркера в клетках ограничено, что определяет необходимость оперативной работы с окрашенным материалом. Обработка пробы непосредственно в день отбора и окраски, безусловно, является наиболее оптимальным и достоверным путём анализа материала. Однако, становится невозможным решение задач с большим числом станций и исследуемых горизонтов, например, в условиях рейса. В связи с этим решение проблемы по сохранению окрашенных проб, то есть маркеров в телах зоопланктёров, выступает одной из ключевых задач.

3.3.1. Метод сохранения окраски в щелочной среде (Эксперимент III).

После стандартной окраски пробы организмы отмывались от красителя в щелочном ($\text{pH} > 8$) фильтрате ($< 0,2$ мкм) морской воды и сохранялись в нем до момента обработки. Цвет окрашенных организмов восстанавливался после снижения pH ниже 7. Ранее метод успешно применялся на культуре *Acartia tonsa* [118, Tang et al., 2006], поэтому его апробация проводилась нами на модельной культуре *C. aquaeduicis* – достаточно крупных и удобных в разведении копепод.

Эксперимент включал 3 схемы обработки проб после их стандартной окраски: **A1** – подщелачивание среды, её подкисление в этот же день (без хранения) и учет степени окраски и ДЖО, **A2** – подщелачивание среды, хранение пробы в течение суток ($+4^\circ\text{C}$), подкисление и учет степени окраски и ДЖО, **K (контроль)** – учет степени окраски и ДЖО сразу после окраски без подщелачивания/подкисления среды и хранения пробы. В контроле (**K**) доля хорошо окрашенных организмов (L), которая соответствует величине ДЖО, составила 82% (64 особи из 78 исследованных), слабоокрашенных – 18% (Q), неокрашенных (D) – 0% (рис. 3.3, А, проба **K**).

Только часть особей *C. aquaedulcis* в пробах *A1* и *A2* восстановили яркую окраску, сопоставимую по интенсивности с контролем (рис. 3.4). Ранение окрашенных организмов в щелочной среде вело к значительному снижению степени их окраски – доля L в пробах *A1* и *A2* снижалась, соответственно, до 28% и 17%, тогда как доля Q увеличивалась, соответственно, до 65% (*A1*) и 83% (*A2*) (см. рис. 3.3, А). Полученные в эксперименте результаты можно охарактеризовать, как отрицательные, поскольку тестируемый метод не обеспечивал сохранности окрашенных проб, а величины ДЖО не воспроизводились даже после непродолжительного хранения проб. В методологическом исследовании [118, *Tang et al.*, 2006] было показано, что в щелочной среде копеподы *A. tonsa* сохраняли окраску до двух недель.

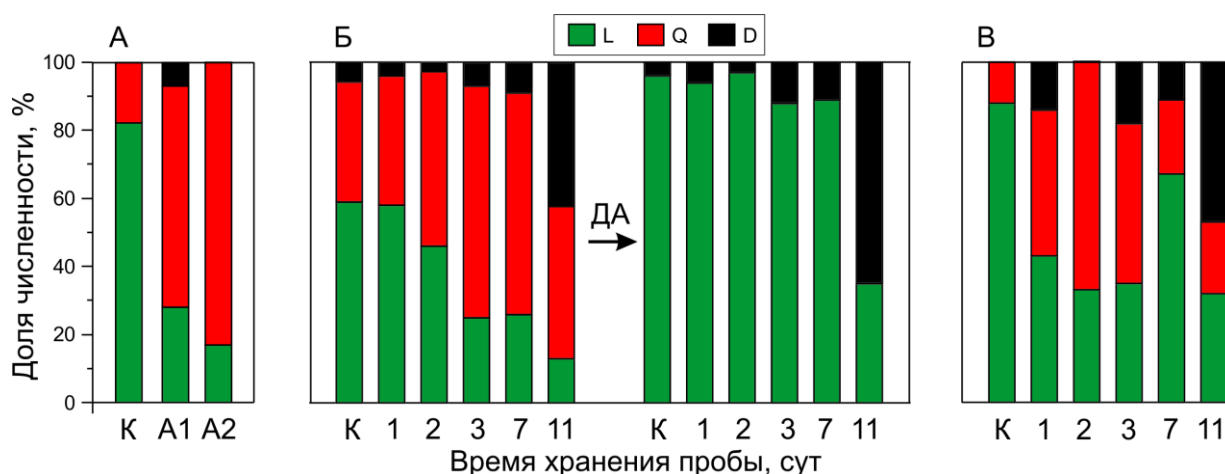


Рис. 3.3. Изменение доли хорошо окрашенных или живых (L), неокрашенных или мёртвых (D) и «спорных» (Q) организмов при сохранении проб культуры *Calanipeda aquaedulcis* (А) и природного зоопланктона (Б – Cirripedia, В – Copepoda) после их окраски НК. К – контроль, ДА – дискриминантный анализ, *A1* и *A2* – см. описание в тексте



Рис. 3.4. Интенсивность окраски НК у копепод *Calanipeda aquaedulcis* в пробах **K** (слева), **A1** (в центре) и **A2** (справа)

Однако, принимая во внимание наши результаты, следует с осторожностью применять данный метод на природных пробах зоопланктона со сложной видовой структурой, поскольку степень сохранности окраски организмов может зависеть от их видовой принадлежности (и каких-то иных, неизвестных факторов).

В экспериментах с культурой *C. aquaedulcis* было отмечено снижение окрашенности организмов после фиксации проб формальдегидом (ФА), поэтому в ходе апробации метода на природном сообществе зоопланктона применяли низкую концентрацию ФА (0,2%). При этом часть жизнеспособных организмов (основу которых в пробе составляли личинки усоногих ракообразных Cirripedia) сохраняли двигательную активность на третьи сутки эксперимента, что позволило дополнительно проверить корректность окраски организмов. Среди подвижных особей не было встречено неокрашенных.

Доля живых организмов (L) в природной пробе составляла около 60% (контроль), сохранялась неизменной спустя 1 сутки хранения и постепенно снижалась до 10% к 11 суткам хранения (см. рис. 3.3, Б), что указывало на утрату окраски зоопланктоном с течением времени. Соответственно,

увеличивалась доля особей со «спорной» (слабо выраженной или фрагментарной) окраской (Q) и тех, окраска которых не была восстановлена после подкисления среды (D). Цвет личинок циррипедий менялся от ярко-красного к розовому – иллюстрации хорошо окрашенных, слабо окрашенных и неокрашенных циррипедий приведены на рис. 3.5. Таким образом, были подтверждены предположения, выдвинутые на основе результатов по культуре копепод – длительное (более 1 суток) хранение природных проб зоопланктона после их окраски НК может приводить к существенной недооценке ДЖО.

Применение дискриминантного анализа (ДА) для классификации «спорных» организмов на живые или мертвые, как оказалось, может снижать величину этой ошибки. Результаты ДА приведены на рис. 3.3 Б и включают только совокупности L и D, поскольку каждая из «спорных» особей была отнесена к одной из них.

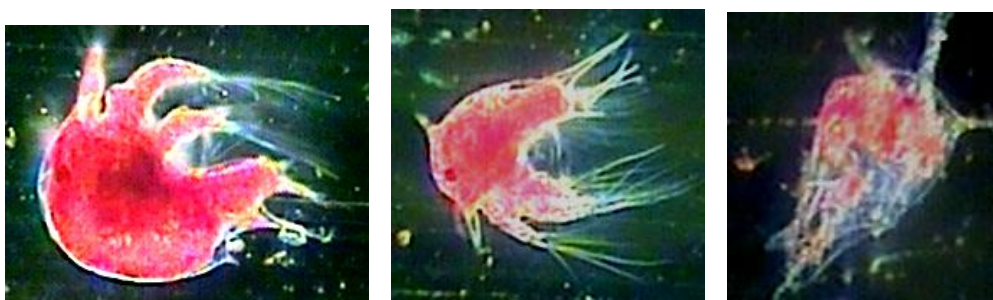


Рис. 3.5. Интенсивность окраски НК личинок Cirripedia, отнесенных к категориям L (слева), Q (в центре) и D (справа)

При хранении до 2 суток, оценки ДЖО не отличались от контроля, через 3-7 дней происходило их небольшое снижение, и лишь на 11-е сутки – существенное снижение. Следует отметить, что доля D могла действительно возрасти из-за низких концентраций фиксатора, сохранения жизнеспособности некоторых организмов (как отмечалось выше) и их гибели уже в ходе эксперимента.

Эксперимент с пробой зоопланктона, содержащей большие количества копепод, позволил исследовать сохранение окраски НК у этой

группы. Степень окраски копепод была заметно выше, чем личинок усоногих раков, цвет восстанавливался лучше, а во многих случаях его интенсивность после восстановления была не ниже, чем в контроле в день отбора пробы. Наилучшие результаты получены для *O. davisae* (рис. 3.6).

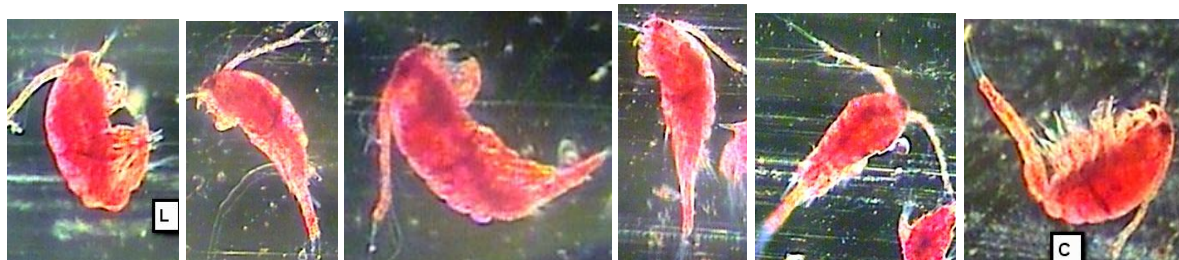


Рис. 3.6. Восстановление окраски НК копеподы *Oithona davisae* при разной продолжительности хранения в щелочной среде. Слева направо: контроль (К), 1, 2, 3, 7 и 11 сутки хранения

Высокое качество окраски отдельных особей копепод, однако, не служило гарантией хорошей сохранности окраски у всей исследуемой выборки – доля L значительно снижалась с 90% до 40% уже спустя сутки хранения и оставалась на этом уровне до конца эксперимента (рис. 3.3 В). Как и в пробе с циррипедиями, доля «спорных» особей Q возрастала на средней стадии эксперимента за счет части L (плохое восстановление цвета), доля мёртвых особей D – к концу эксперимента за счёт части Q (невосстановление цвета и гибель организмов, которые в течение некоторого времени могли сохранять жизнеспособность).

3.3.2. Метод заморозки на фильтре (Эксперимент IV).

После разморозки проб организмы, смытые морским фильтратом с фильтра, были в хорошем состоянии, т.е. сохранили форму тела, целостность покровов и тканей. Подобной картины не наблюдалось при заморозке пробы морской воды целиком (организмы в жидкой фазе), когда копеподы имели слабый розовый цвет или были почти бесцветны.

Результаты экспериментов показали, что после подкисления среды происходило полное восстановление цвета окрашенных НК организмов (т.е. величины ДЖО соответствовали таковым в контроле), если срок хранения пробы составлял 1 сутки (рис. 3.7). На 13-е сутки наблюдали небольшое (9%) снижение оценок ДЖО. Если подкисления среды не проводили, то со 2-х суток хранения ДЖО снижалась на 30-40%, увеличивался вклад желтой компоненты в цветовую гамму окраски (см. рис. 3.7). Через 24 дня хранения цвет восстанавливался не полностью и лишь у отдельных организмов, а спустя 38 дней – проба обработке не подлежала. При длительном хранении разморозка пробы приводила к образованию большого количества пузырьков газа внутри карапакса копепод, организмы всплывали в камере, затрудняя обработку пробы.



Рис. 3.7. Восстановление окраски копепод при заморозке и хранении на фильтре: контроль (слева), подкисление на 13 суток (в центре), без подкисления на 13 суток (справа)

Таким образом, апробация метода на пробах черноморского зоопланктона дала положительные результаты, которые, в целом, отвечали возможностям метода, описанным его авторами [86, *Elliott, 2009*]. Сравнивая два способа сохранения проб зоопланктона, окрашенных НК, приоритет следует отдавать заморозке на фильтре и восстановлению цвета кислотой. Во-первых, восстановление цвета было возможно в течение более чем 2 недель, с незначительными потерями, тогда как при хранении в

растворе – не более 1 недели. Во-вторых, при подобной окраске проб их удобно хранить в чашках Петри, что является существенным преимуществом при транспортировке большого количества проб.

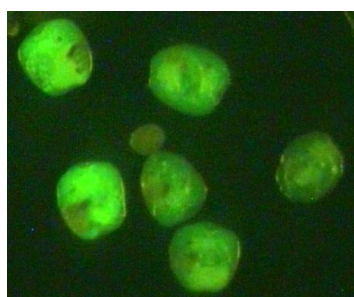
3.4. Сохранение пробы после окраски ДФ

Применение ДФ в полевых исследованиях морского зоопланктона в качестве нового витального красителя потребовало разработки соответствующих методов длительного хранения окрашенных с его помощью проб. Сложность этой задачи связана с быстрым затуханием флуоресценции флуоресцеина – продукта реакции ДФ с ферментами. В данном исследовании были апробированы 2 метода заморозки уже окрашенной пробы – в жидком состоянии и после осаждения организмов на фильтр (т.е. в сухом состоянии). В первом случае окраску и заморозку комбинировали с добавлением фиксатора и криопротектора – диметилсульфоксида (ДМСО). В обоих методах контролем служила степень окрашенности нативной пробы сразу после её отбора.

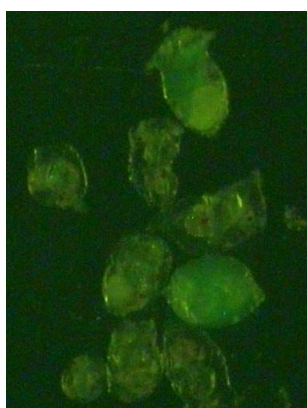
3.4.1. Метод заморозки в жидкой пробе (Эксперимент V).

Анализ окраски замороженных проб показал, что организмы зоопланктонного сообщества Севастопольской бухты в разной степени сохраняли цвет красителя после суточного хранения. Наиболее массовыми в изученных пробах были Rotifera и Copepoda. Коловратки после размораживания ни в одном из случаев (с формальдегидом, с ДМСО или без них) не восстанавливали флуоресценцию той яркости, как в контроле (рис. 3.8). Веслоногие ракообразные, в свою очередь, сохраняли насыщенный цвет, только в образцах с добавлением формальдегида (рис.

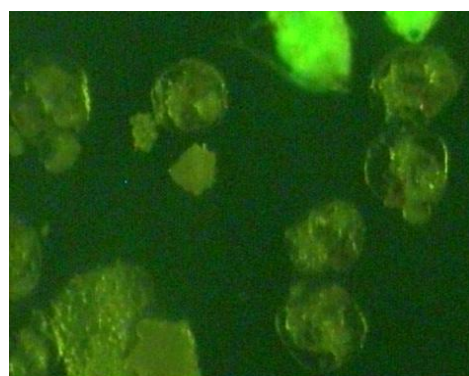
3.9, Б, В), и при его совместном использовании с ДМСО (см. рис. 3.9, В). В отсутствие последнего они имели незначительную деформацию карапакса, обусловленную повреждением тканей при разморозке (рис. 3.9, Б). Тем не менее, интенсивность флуоресценции у копепод была значительно слабее, чем в «свежеокрашенных» пробах контроля, причем она полностью затухала через 1,5 – 2 часа после разморозки, что свидетельствовало о непригодности данного способа сохранения проб черноморского зоопланктона, окрашенных ДФ.



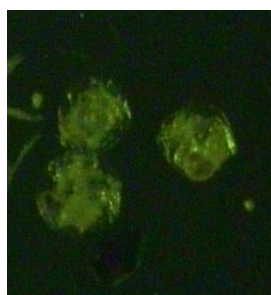
Контроль



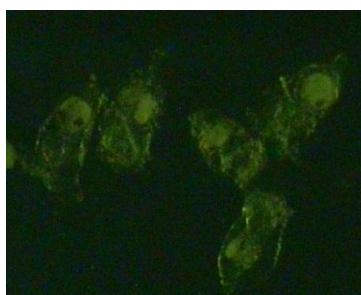
А



Б

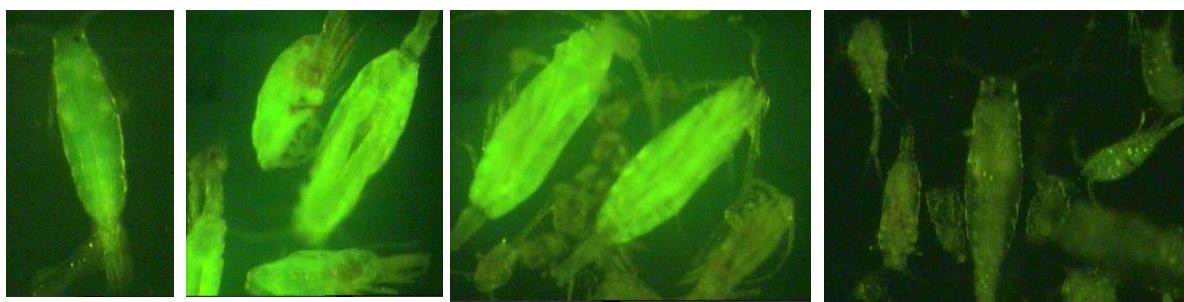


В



Г

Рис. 3.8. Интенсивность окраски коловраток, окрашенных ДФ (контроль) после заморозки (-15°C) (А), в присутствии формальдегида (Б), формальдегида и диметилсульфоксида (В) и самостоятельно, диметилсульфоксида (Г)



А – $t^{\circ}\text{C}$ Б – $\text{FA} + t^{\circ}\text{C}$ В – $\text{FA} + \text{ДМСО} + t^{\circ}\text{C}$ Г – $\text{ДМСО} + t^{\circ}\text{C}$

Рис. 3.9. Интенсивность окраски *Cerioda*, окрашенных ДФ, после заморозки (-15°C) (А), в присутствии формальдегида (Б), формальдегида и диметилсульфоксида (В) и самостоятельно, диметилсульфоксида (Г)

3.4.2. Метод заморозки ДФ на фильтре (Эксперимент VI).

Концентрирование организмов на фильтре (без жидкости) и сохранение их в замороженном состоянии оказалось наиболее эффективным подходом, обеспечивающим наилучшую сохранность особей и их флуоресценции. При этом яркость и цвет флуоресценции значительной доли особей после их размораживания и перевода в жидкую среду соответствовали контролю даже при длительном хранении проб – до 2 недель (рис. 3.10).

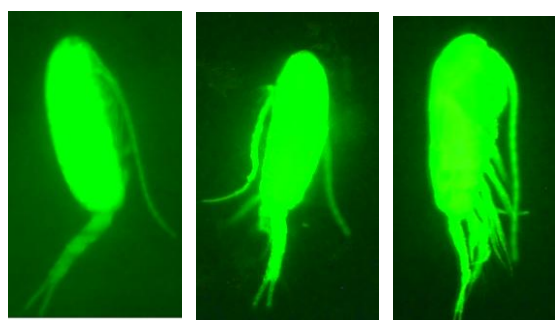


Рис. 3.10. Восстановление флуоресценции копепод *Calanipeda aquaedulcis*, окрашенных ДФ, после их заморозки и хранения на фильтре в течение 1 (слева), 8 (в центре) и 16 суток (справа)

Как и в случае с НК, с увеличением времени хранения проб культуры *C. aquaedulcis* росла доля неокрашенных (D) и слабо окрашенных (Q) организмов (рис. 3.11). Вклад хорошо окрашенных особей, определяемых как «живые» (L), снижался с 98% спустя 1 сутки хранения до 84% на 16 суток. Апостериорные вероятности классификации «спорных» особей были не ниже 98% на 8-е сутки хранения проб и 80% - на 16-е сутки. Вклад красной компоненты (Red) и оттенка (Hue) являлись главными переменными, которые позволяли производить дискриминацию между классами L и D.

Как было отмечено ранее в экспериментах с пробами, окрашенными НК, после двух недель хранения карапаксы калянипед содержали пузырьки газа (рис. 3.12). Это в значительной степени затрудняло обработку проб с помощью камеры Богорова: организмы всплывали и оказывались вне поля зрения инвертированного микроскопа. В связи с этим фотосъемку животных проводили в отдельных каплях на предметном стекле.

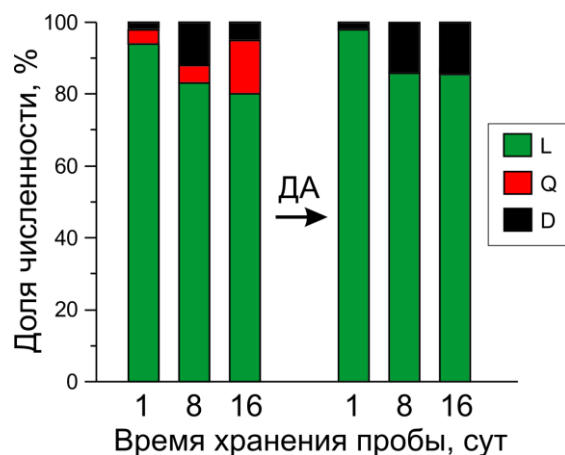


Рис. 3.11. Изменение доли хорошо окрашенных или живых (L), неокрашенных или мёртвых (D) и «спорных» (Q) организмов при сохранении проб культуры *Calanipeda aquaedulcis* на фильтре после их окраски ДФ. ДА – дискриминантный анализ



Рис. 3.12. Образование пузырьков в копеподах *Calanipeda aquaedulcis* после их длительного хранения в замороженном виде

3.5. Одновременное окрашивание культуры копепод с помощью НК и ДФ (Эксперимент VII)

Одновременное окрашивание одной и той же пробы зоопланктона двумя маркерами – НК и ДФ могло бы оказаться полезным для интеркалибровки обоих методов и позволило бы получить дополнительную информацию о состоянии исследуемой популяции организмов. Такой подход представлялся возможным, в первую очередь, из-за отличий в цвете окраски и режимах микроскопирования, используемых для каждого из маркеров. К сожалению, применение стандартных протоколов окраски не дало положительного результата.

Независимо от последовательности окрашивания проб *C. aquaedulcis* (ДФ после НК или наоборот) живые копеподы имели яркую зеленую флуоресценцию в люминесцентном режиме (качественная окраска ДФ) и бледно оранжевый цвет в световом режиме – вместо типичной для НК ярко-красной окраски (рис. 3.13). В некоторых случаях окраска НК была настолько слаба, что отличить живых особей от мертвых (бесцветных) было

сложно. Таким образом, комбинирование двух красителей никак не влияло на качество окраски ДФ, но значительно снижало насыщенность окраски НК, что могло отразиться на достоверности результатов, получаемых с помощью НК.

Изменение оттенка окраски НК в присутствии ДФ было показано при сравнении результатов, полученных для одной и той же пробы после её окраски НК (контроль) и комбинацией обоих красителей (рис. 3.14). Анализ цветовых характеристик в каждом из этих случаев выявил отличия по двум переменным – зелёному цвету (Green) и оттенку (Hue) (см. диаграмму на рис. 3.14). При комбинировании красителей вклад зелёной компоненты был выше, что может косвенно указывать на маскирующий эффект ДФ, проявляющийся не только в люминесцентном, но и в световом режиме микроскопирования. Вместе с тем, не исключено химическое взаимодействие красителей или какие-либо физиологические эффекты, затрагивающие механизмы окраски НК в присутствии ДФ. В любом случае, полученный результат говорит о невозможности одновременного применения двух маркеров – НК и ДФ, для окрашивания одной и той же пробы зоопланктона.

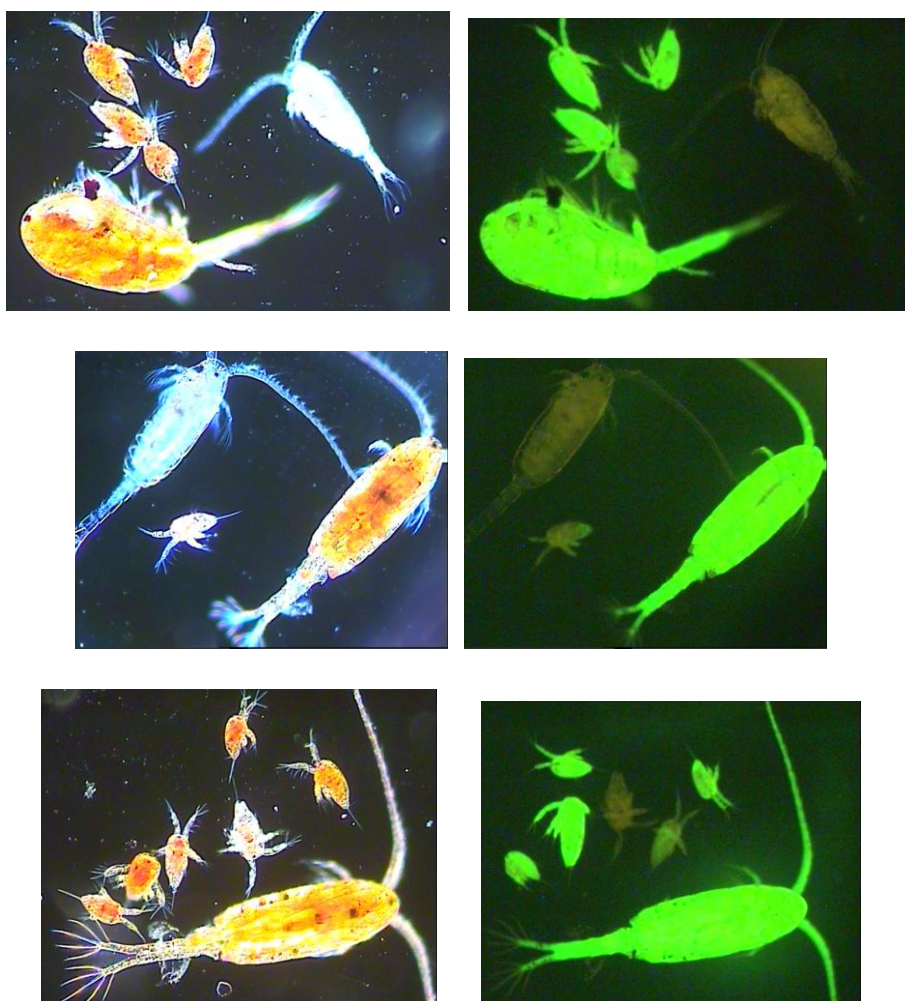


Рис. 3.13. Микрофотографии копепод *Calanipeda aquaedulcis* в световом (слева) и люминесцентном (справа) режимах после их комбинированной окраски с помощью НК и ДФ

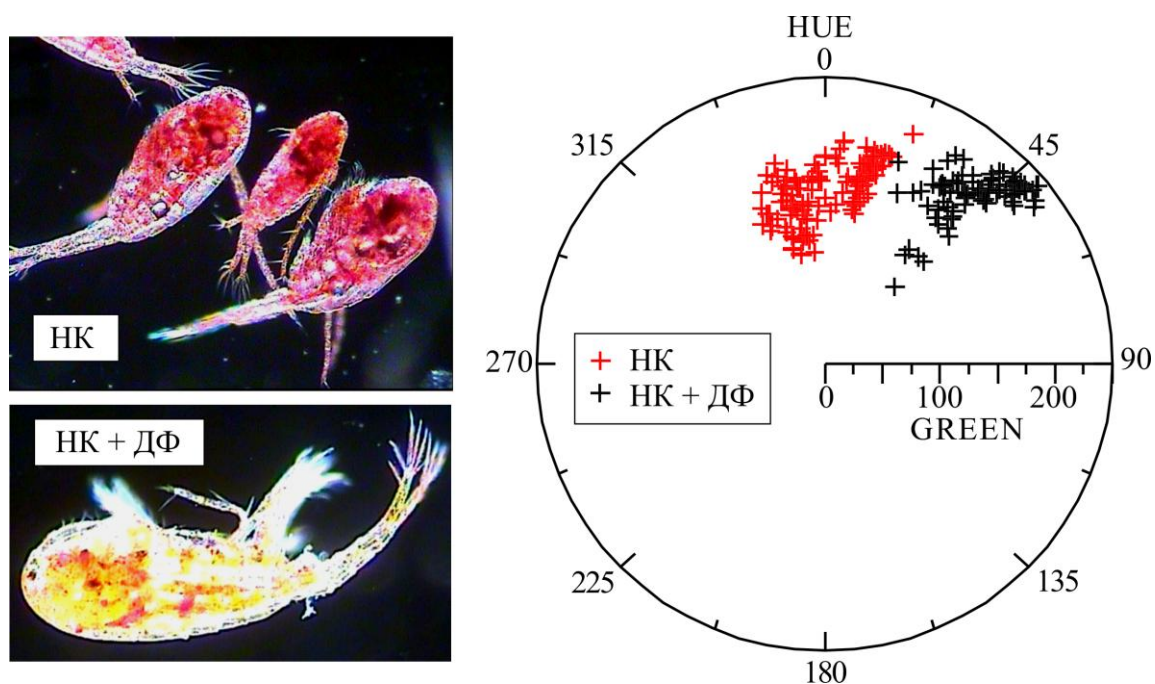


Рис. 3.14. Характер окраски (фото слева, световая микроскопия) и цветовые компоненты (диаграмма справа, $n=210$) живых копепоид *Calanipeda aquaedulcis* при использовании нейтрального красного (НК) и комбинации красителей (НК + ДФ). Hue – цветовой оттенок, Green – зелёный цвет

Таким образом, комбинирование двух маркеров (ДФ и НК) ведет к снижению эффективности окраски НК и получаемых с его помощью результатов. Раздельное применение обоих красителей на одной и той же пробе требует больших трудозатрат и времени, но оправдано возможностью уточнить оценки ДЖО и получить дополнительную информацию о скорости смертности организмов.

РАЗДЕЛ 4

УСОВЕРШЕНСТВОВАННАЯ ПРОЦЕДУРА КЛАССИФИКАЦИИ ОРГАНИЗМОВ ЗООПЛАНКТОНА НА ЖИВЫЕ И МЁРТВЫЕ ПОСЛЕ ИХ ОКРАСКИ ВИТАЛЬНЫМИ КРАСИТЕЛЯМИ (ЭКСПЕРИМЕНТ VIII)

Результаты анализа цветовых характеристик копепод в живой и заведомо мёртвой культурах *C. aquaedulcis* после их окраски обоими красителями представлены на рис. 4.1 (Эксперимент VIII). На 2-параметрических графиках живые и мертвые особи образуют хорошо различимые скопления точек (каждая из которых представляет отдельную особь). Обособленность кластеров живых (L) и мёртвых (D) организмов в пространстве цветовых переменных позволяла проводить их достоверную классификацию, причем процедура классификации не требовала применения дискриминантного анализа, поскольку в анализируемых выборках отсутствовали особи со спорной окраской. Подобный подход широко применяется в цитометрическом анализе, который, по своей сути, сводится к идентификации кластеров на 2-параметрических цитограммах.

Чтобы выяснить, отличаются ли разные стадии развития *C. aquaedulcis* (N – науплии, C – копеподитные стадии, A – взрослые особи) по своим цветовым характеристикам, выполнен анализ канонических корреляций, определены последовательные канонические корни и функции. Характер дискриминации для каждой дискриминантной (канонической) функции представлен на рис. 4.2. Во всех выборках корень 1 (root 1) в большей степени дискриминирует между группами, нежели корень 2 (root 2). В выборках живых организмов (левые графики) кластеры менее обособлены в пространстве, чем в выборках мёртвых. Это указывает на то,

что разные возрастные стадии окрашенных копепод не отличались между собой по характеру окраски.

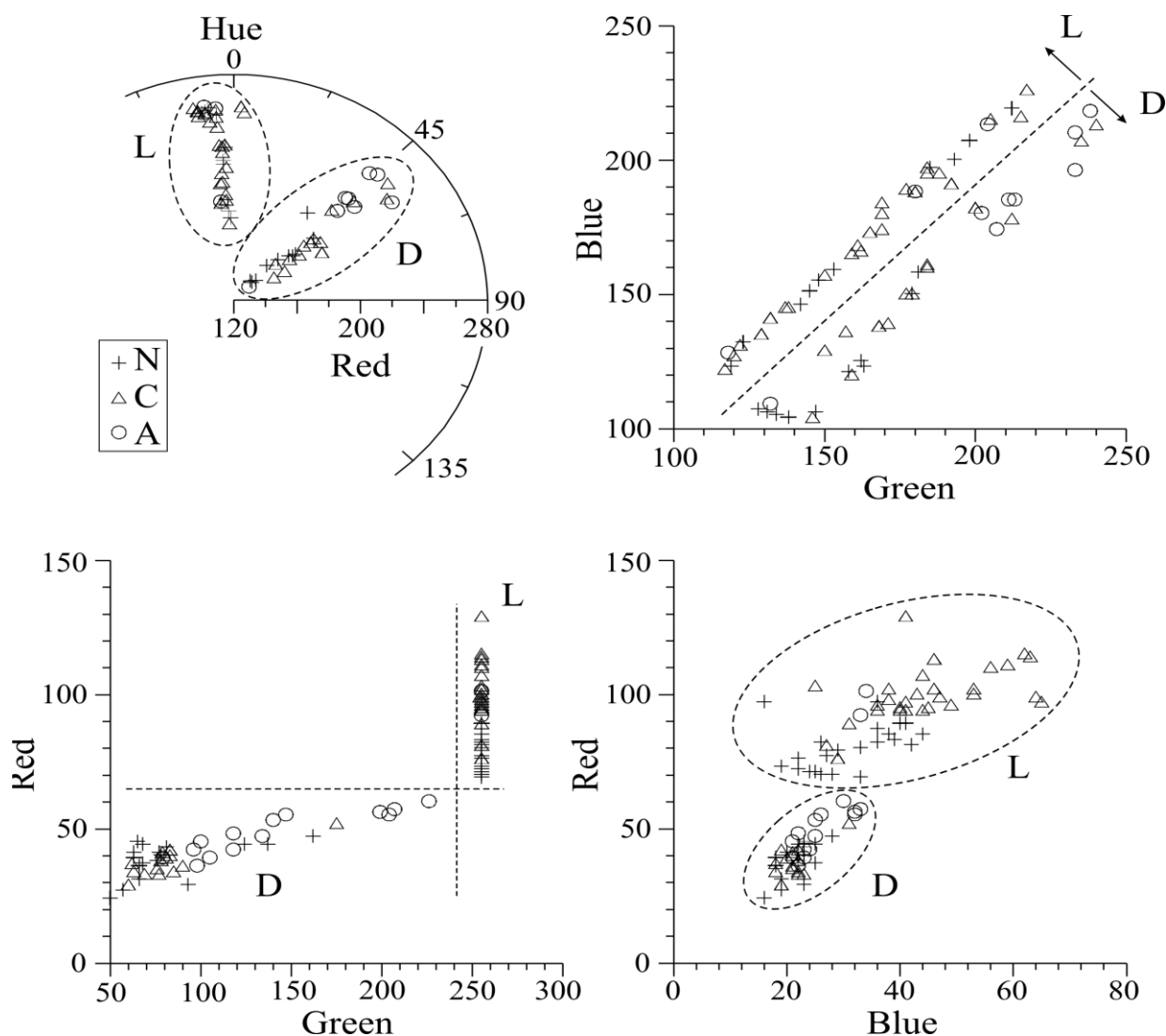


Рис. 4.1. Кластеры окрашенных НК (верхние графики) и ДФ (нижние графики) живых (L) и мёртвых (D) особей *C. aquaedulcis* на разных стадиях развития (N – науплии, C – копеподиты, A – половозрелые особи) в координатах цветовых компонент (Hue – цветовой оттенок, Red – красный, Green – зелёный, Blue – синий). Пунктирные линии обозначают условные границы кластеров

Мёртвые неокрашенные организмы (правые графики), наоборот, постепенно меняли цветовую гамму в соответствии со стадией развития –

кластеры науплиев, копепоидов и взрослых особей образуют хорошо заметную последовательность в пространстве канонических функций (её направленность обозначена стрелками на рис. 4.2). Таким образом, окраска красителями уменьшала цветовые различия между стадиями развития *C. aquaedulcis*, что должно положительно сказываться на возможностях метода и качестве оценки долей живых/мёртвых особей в популяции копепоид. Один и тот же методический подход может применяться к анализу смешанных проб, включающих разные стадии развития.

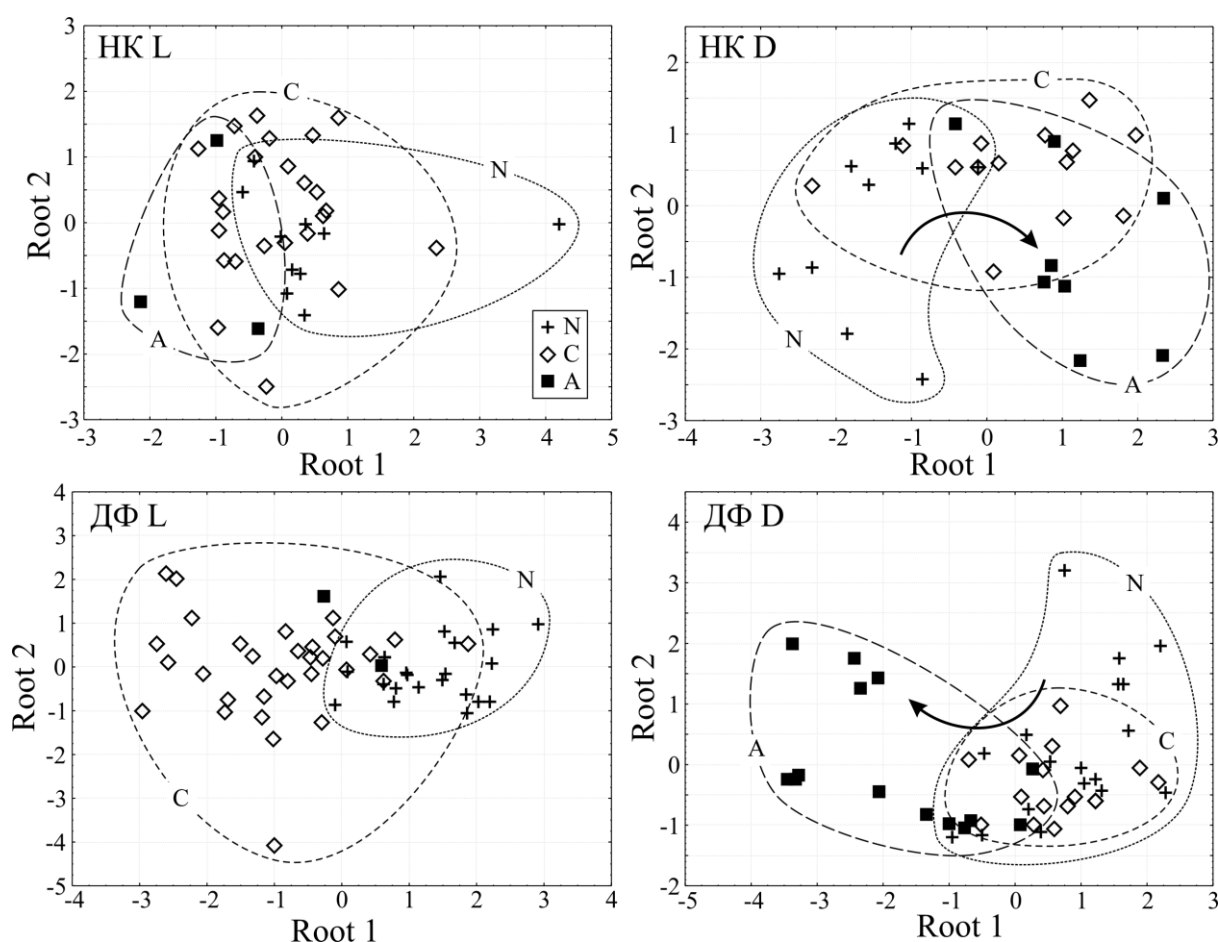


Рис. 4.2. Диаграмма рассеяния канонических значений для дискриминантных функций 1 и 2 окрашенных НК (верхние графики) и ДФ (нижние графики) живых (L) и мёртвых (D) особей *C. aquaedulcis* на разных стадиях развития (N – науплии, C – копепоиды, A – половозрелые особи) в координатах цветовых компонент (Hue – цветовой оттенок, Red – красный, Green – зелёный, Blue – синий)

Стандартизованные коэффициенты дискриминантных функций (табл. 4.1) характеризовали направление и вклад цветовых переменных в величину дискриминантных функций. Как видно из приводимой таблицы, функция 1 отвечала за 95 – 97% (ДФ) и 70 – 80% (НК) объясненной дисперсии и, соответственно, представляла наибольший интерес при проведении анализа.

Таблица 4.1.

Стандартизованные коэффициенты дискриминантных функций (Кор. – корень, СЗ – собственное значение, КДОД – кумулятивная доля объясненной дисперсии)

Переменная	ДФ, D		ДФ, L		НК, D		НК, L	
	Кор. 1	Кор. 2	Кор. 1	Кор. 2	Кор. 1	Кор. 2	Кор. 1	Кор. 2
Hue	-2,07	-0,48	6,44	-4,89	1,23	-0,19	-0,58	0,21
Saturation	0,55	-1,60	4,50	7,44	-1,37	-0,66	-7,60	-3,83
Brightness	28,35	-15,53	1,94	36,81	4,44	-18,79	-10,56	25,07
Red	-3,20	0,12	2,45	-1,80	5,45	9,56	20,79	-18,56
Green	-27,69	17,69	-8,98	-36,63	-6,55	11,65	-8,00	-9,34
Blue	1,85	-0,63	2,03	8,15	-2,64	-3,25	-8,41	0,07
СЗ	1,50	0,07	1,26	0,03	1,13	0,25	0,19	0,07
КДОД	0,95	1,00	0,97	1,00	0,81	1,00	0,71	1,00

Стадии развития в выборке заведомо мёртвых (неокрашенных) организмов отличались, в первую очередь, по переменным Green, Brightness и Red, которые вносили наибольший вклад в дискриминантную функцию 1. При окраске ДФ науплии отличались от копеподитных стадий более насыщенным зеленым цветом (переменные Green, Hue, Saturation функции

1), при окраске НК – более глубоким красным цветом (переменные Red, Brightness функции 1). Однако, как было сказано выше, цветовые отличия между разными возрастными стадиями копепод после их окраски были незначительными и не могли повлиять на достоверность классификации всей выборки особей на живых и мёртвых.

В пробах зоопланктона недостаточное или неспецифическое окрашивание организмов затрудняло их классификацию. Доля особей со спорной окраской (Q) достигала в пробах 1 и 2, соответственно, 18 % и 14 %.

На графиках эти особи образуют облако точек между кластерами L и D (рис. 4.3.). Исследователь может провести условную границу между кластерами, как это делается в случае с цитометрическими данными (в цитометрическом анализе эта процедура именуется гейтингом).

В этом случае качество классификации организмов будет выше, чем при традиционном визуальном анализе под микроскопом, однако сохранится некоторая степень субъективности в выборе положения условной границы. Дискриминантный анализ цветовых переменных позволил выявить переменные, обладающие наибольшими дискриминантными способностями в определении живых/мёртвых копепод (табл. 4.2). По величинам лямбды Уилкса и F-значениям можно сделать вывод, что предложенная классификация корректна ($p < 0,0001$). Редукция количества используемых независимых переменных не привела к снижению качества и значимости классификации.

Значение частной лямбды характеризует единичный вклад соответствующей переменной в разделительную силу модели – чем меньше статистика, тем больше вклад переменной в общую дискриминацию.

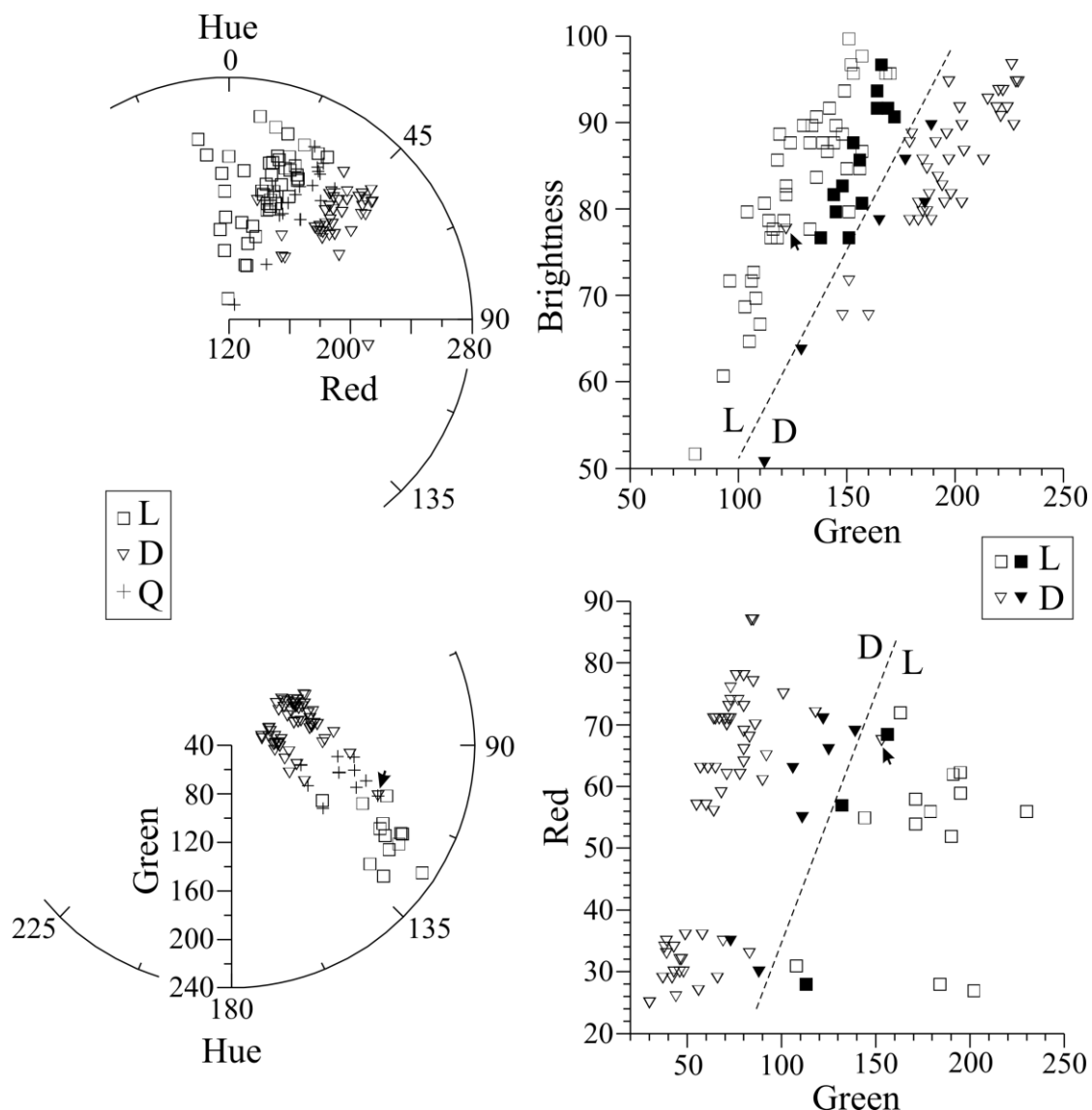


Рис. 4.3. Копеподы из окрашенных НК (верхние графики) и ДФ (нижние графики) проб морского зоопланктона, классифицированные по визуальным признакам как живые (L), мёртвые (D) и сомнительные (Q) в координатах цветовых компонент (Hue – цветовой оттенок, Red – красный, Green – зелёный, Brightness – яркость). Справа: результаты дискриминантного анализа – «сомнительные» особи отнесены к одному из классов – L или D (символы с чёрной заливкой). Стрелками показаны особи из обучающей выборки, которые, как показывает дискриминантный анализ, классифицированы исследователем ошибочно

Из таблицы видно, что при окраске НК (проба 1) наибольший вклад в общую дискриминацию вносят переменные Green и Hue, при окраске ДФ (проба 2) – переменные Green и Red. Можно было бы ожидать, что характер окраски организмов НК будет определяться исключительно красной цветовой компонентой, а ДФ – зелёной. Однако, в соответствии с анализом, другие цветовые характеристики обладают не меньшей (а иногда и большей) дискриминационной способностью. В случае с НК, например, это связано с тем, что как живые (красный цвет), так и мертвые (бурый цвет) особи имеют высокий уровень красного цвета, однако различаются по своему цветовому тону (Hue), который формируется благодаря вкладу других цветов, в первую очередь, зелёного (Green). Живые организмы, окрашенные ДФ, имеют ярко зеленую флуоресценцию (много зеленого, мало других цветов) в отличие от мёртвых особей со слабым свечением (мало зелёного) и бурым оттенком (присутствие красного).

Характер и уровень внешнего освещения в лаборатории может оказывать существенное влияние на цвет организмов и, следовательно, на дискриминационную способность разных цветовых переменных. Добавление искусственного освещения в лаборатории в ходе анализа пробы 2 (окраска ДФ) приводило к смещению кластеров вдоль красной цветовой компоненты Red (рис. 4.3, график справа внизу) – на графике каждый из кластеров, L и D, имеет верхнюю и нижнюю «секции», которые соответствуют разным режимам освещения в лаборатории. Это не отразилось на результатах классификации организмов на живые и мёртвые в данной пробе (как графическими, так и статистическими методами), но, несомненно, может приводить к трудностям в анализе данных.

Дискриминационная модель, полученная на основе обучающих выборок L и D, позволила классифицировать выборку Q, отнеся каждую из составляющих её особей к одному из классов – L или D, в соответствии с апостериорными вероятностями. В среднем, величины апостериорных вероятностей в обеих пробах составили около 93 % (табл. 4.2), что

указывает на высокое качество проведенной классификации (её результаты в графическом представлении показаны на рис. 4.3).

Таблица 4.2.

Модель классификации организмов морского зоопланктона на живые и мертвые по цветовым характеристикам. Приведены переменные, значение которых в классификационной модели велико (уровень значимости $p < 0,05$)

Переменная	Лямбда Уилкса λ	Частная лямбда	F-значение	p	Толерантность
Проба зоопланктона 1, окраска НК Лямбда Уилкса $\lambda = 0,129$; $F(4, 78) = 131,6$; $p < 0,0000$					
Hue	0,145	0,893	9,38	0,0030	0,8277
Brightness	0,136	0,949	4,22	0,0433	0,0008
Green	0,258	0,500	78,13	0,0000	0,2783
Результаты классификации выборки Q ($n = 19$): апостериорные вероятности $0,927 \pm 0,147$ (ст. откл.)					
Проба зоопланктона 2, окраска ДФ Лямбда Уилкса $\lambda = 0,137$; $F(4, 66) = 104,0$; $p < 0,0000$					
Hue	0,146	0,939	4,25	0,0431	0,2399
Red	0,159	0,861	10,62	0,0018	0,1387
Green	0,170	0,806	15,92	0,0002	0,0408
Результаты классификации выборки Q ($n = 10$): апостериорные вероятности $0,933 \pm 0,128$ (ст. откл.)					

Таким образом, новый подход, основанный на измерении цветовых переменных отдельных особей и последующем дискриминантном анализе данных, позволяет оценить статистическую достоверность самих

результатов определения долей живых и мертвых особей в пробе, избежать какой-либо субъективности в измерениях, т.е. выводит исследования некрозоопланктона на качественно новый уровень. Новый метод успешно применен при исследовании сезонной динамики доли живых Copepoda в планктоне Севастопольской бухты (см. раздел 6) [15, *Литвинюк и др., 2011*].

Микрофотосъёмка. Съёмку окрашенных организмов следует проводить на цифровую фотокамеру в цветном режиме. Автоматический режим камеры не рекомендуется использовать по следующей причине. Если в поле зрения попадают только яркие (например, живые организмы, окрашенные ДФ) или только тёмные объекты (близкие по яркости к темному фону мёртвые организмы), то проводимая фотокамерой автокоррекция изображений будет искажать цветовые и яркостные характеристики объектов, и, как следствие, сопоставление таких изображений будет невозможным. Рекомендуется выбрать настройки фотокамеры в ручном режиме таким образом, чтобы избежать, во-первых, пересветов на наиболее ярких объектах (т.е. потери информации о яркости и цвете) и, во-вторых, сливания объектов с фоном (например, неокрашенные объекты на тёмном поле люминесцентного микроскопа), и сохранять эти настройки неизменными в течение фотосъёмки всей пробы. Это гарантия того, что изображения и живых, и мёртвых организмов одной и той же пробы получены при одинаковых условиях и, следовательно, могут быть успешно использованы в дальнейшем анализе. Уровень и характер освещения в лаборатории следует сохранять постоянными на протяжении съёмки всей пробы, поскольку его изменение приводит к смещению кластеров на графиках и может затруднить анализ данных.

Отличия в спецификации применяемых фотокамер не могут отразиться на качестве получаемых результатов. Это означает, что анализ одной и той же пробы зоопланктона, проведённый на разном оборудовании,

но в соответствии с описанным здесь методом, даст одинаковые результаты по соотношению живых и мёртвых организмов в пробе.

Серии фотоснимков организмов, полученные для той или иной пробы, представляют собой источник информации для дальнейшего анализа, поэтому они не должны быть изменены при редактировании, перезаписи файлов и других операциях. Такие свойства как яркость, контраст, насыщенность, цветовой баланс и другие должны оставаться в оригинальных изображениях без изменений.

Измерение цветовых/яркостных характеристик организмов. В качестве программного обеспечения для дальнейшей работы с изображениями подходит любой редактор растровой графики, позволяющий определять основные цветовые и яркостные характеристики любого из пикселей изображения в соответствии с цветовыми моделями HSB и RGB и осреднять их значения в выбранной пользователем области изображения. Для этих целей можно использовать программный пакет Adobe Photoshop или ряд бесплатных графических редакторов, которые свободно распространяются в Интернете, например, Eyedropper 4.0 beta, Pixel Pick 1.5, SI ColorPicker 1.0 и др. Однако программа ImageRegionColor (IRC) обеспечивает максимальную эффективность и качество обработки проб, поскольку написана специально для целей и задач приводимого в данной работе анализа.

Для каждой анализируемой особи получают один набор значений упомянутых выше характеристик, поэтому важны локализация и способ отбора пробы цвета в пределах границ изображения организма. Отбор должен проводиться в зонах с наибольшей интенсивностью окраски (у окрашенных ДФ или НК копепод это – цефалоторакс). У неокрашенных организмов используется та же зона. Если изображение интересующей области неоднородно по цвету и яркости, необходимо выделять всю окрашенную область (инструмент «лассо», Lasso Tool, в Adobe Photoshop) и осреднять её яркостные и цветовые характеристики, и только потом

проводить измерение (как это и делалось в данной работе). Важно, чтобы процедура осреднения была унифицирована для анализа всей пробы. В Adobe Photoshop она может быть выполнена с помощью фильтра «Среднее размытие» (меню Filter > Blur > Average), а измерение цветовых характеристик проведено с помощью инструмента «Пипетка» (Eyedropper Tool). В программе IRC необходимо вручную выделять нужную область, а остальные процедуры проводят автоматически.

Алгоритм обработки пробы. Этап I. Отбор пробы мезозoopланктона и её окраска для идентификации живых/мёртвых организмов. Этап II. Исследование репрезентативной выборки организмов под микроскопом для: а) сортировки особей по классам «Живые» (L), «Мёртвые» (D), «Сомнительные» (Q) по визуальным признакам (интенсивности окраски); б) получение цифровых изображений каждой особи. Этап III. Измерение средних для каждой особи цветовых и яркостных характеристик (цветовые модели HSB, RGB) в графическом редакторе. Этап IV. Сведение полученных данных в таблицу в формате, пригодном для дискриминантного анализа. Этап V. Применение дискриминантного анализа для: а) уменьшения размерности данных (пошаговый анализ с включением переменных); б) построения классификации объектов, используя классы L и D в качестве обучающей выборки; в) выделения в соответствии с дискриминантной моделью классов L или D среди организмов класса Q.

Применение метода в исследованиях других гидробионтов. Одним из преимуществ описанного подхода является его универсальность как в смысле выбора объектов исследования, так и целей их классификации. Он может быть применён для анализа фотоизображений не только зоопланктона, но и любых других окрашенных организмов, будь то икра рыб, личинки полихет или микробные плёнки. Выбор красителя не накладывает каких-либо ограничений на процедуру обработки изображений, поскольку во всех случаях для классификации объектов

используется один и тот же критерий – степень и характер их окраски. Более того, если цели окраски организмов сводятся не столько к их классификации на живые и мёртвые, а, например, к объективизации описания окраски любого объекта, то это существенно расширяет область применения метода.

Затраты времени на обработку пробы зоопланктона в соответствии с предлагаемым методом достаточно велики (2 – 3 ч) и сопоставимы с таковыми при проведении классического визуального анализа проб. Однако увеличение качества получаемых результатов – не единственное оправдание подобных затрат. В перспективе метод может быть эффективно использован в автоматических анализаторах нового поколения, таких, например, как портативный проточный цитометр FlowCAM (Fluid Imaging Technologies, Inc., США) с модулем визуализации объектов – как в световом, так и флуоресцентном режимах [82, *Culverhouse et al.*, 2006; 114, *Sieracki et al.*, 1996]. Кроме стандартных для цитометра функций, система FlowCAM обеспечивает автоматическое распознавание образа каждого из объектов и сохранение его цифрового изображения. Визуализация объектов позволяет исследователю уточнить таксономическую принадлежность присутствующих в пробе организмов. Время, затрачиваемое на анализ одной пробы зоопланктона (с классификацией организмов на живые и мёртвые), может быть сокращено на порядок при её полуавтоматической обработке, которая, в свою очередь, возможна при включении соответствующих программных модулей в программное обеспечение FlowCAM.

РАЗДЕЛ 5

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОКРАСКИ РАЗНЫХ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ГРУПП ЧЕРНОМОРСКОГО ЗООПЛАНКТОНА С ПОМОЩЬЮ ДФ И НК

В процессе сбора материала по копеподам накопился значительный материал и по окраске других групп зоопланктона. В связи с этим возникла идея обобщить эти данные. Таким образом, цель состояла в определении таксономических групп сетного зоопланктона, окраска которых витальными маркерами – нейтральным красным (НК) и диацетатом флуоресцеина (ДФ), позволила бы эффективно оценивать доли живых и мертвых организмов в их природных популяциях или сообществах.

Таблица 5.1.

Количество исследованных особей различных таксонов черноморского зоопланктона после окраски ДФ и НК. S – ярко окрашенные организмы, NS – неокрашенные (бесцветные), Q – организмы с неявной окраской. В скобках указаны подвижные организмы

Таксоны	ДФ			НК			Общее кол-во исследованных особей	
	S	NS	Q	S	NS	Q	ДФ	НК
ГОЛОПЛАНКТОН								
<i>Evadne spinifera</i> P.E. Müller, 1867	5	0	8 (1)	0	26 (1)	0	13	26
<i>Penilia avirostris</i> Dana, 1849	2	14	10 (2)	0	85 (2)	0	26	85

<i>Pleopis polyphemoides</i> (Leuckart, 1859)	9	20 (2)	11 (1)	13	59	17	40	89
<i>Pseudevadne tergestina</i> Claus, 1877	1	3	0	0	28 (1)	0	4	28
<i>Noctiluca scintillans</i> (Macartney) Kofoid & Swezy, 1921	2	17	0	0	1	0	19	1
<i>Oikopleura dioica</i> Fol, 1872	6	0	1	5	3	6	7	14
<i>Parasagitta setosa</i> Müller, 1847	0	2	1	3	2	3	3	8
Rotifera	428	43	87	14	17	107	558	138
МЕРОПЛАНКТОН								
Bivalvia larvae	0	5	0	1	58	2	5	61
Cirripedia nauplius	9	23	31	154	16	41	63	211
Decapoda larvae	3	1	0	0	3	0	4	3
Gastropoda larvae	1	3	2 (2)	13	3	4	6	20
Hydromedusae	0	1 (1)	0	1	0	6	0	7
Pisces larvae	0	0	0	2	0	0	0	2
Pisces ova	3	0	0	2	0	0	3	2
Polychaeta larvae	9	6	6	15	2	3	21	20

Было отснято и впоследствии проанализировано более 1500 цифровых изображений представителей различных групп и таксонов зоопланктона в размерном диапазоне от 60 мкм (велигеры *Bivalvia*) до 2,2 мм (*Parasagitta setosa*). Особенности окраски витальными маркерами (ДФ и НК) были рассмотрены у представителей 16 таксонов черноморского зоопланктона. Полученные результаты сведены в табл. 5.1. Сложность анализа полученных данных состояла в недостаточном размере выборок по некоторым таксонам, что в ряде случаев не позволило сделать однозначные выводы.

Учитывая свойства обоих маркеров окрашивать только живые организмы, можно предположить, что те особи, которые на фотоизображениях не имели цвета относятся к условно мёртвым, а с яркой окраской – к живым. Для того чтобы утверждать, пригоден ли вид после окраски к дифференцированию на живую/мёртвую фракции, изучаемая

выборка должна содержать как окрашенные (S), так и неокрашенные организмы (NS). Присутствие большого количества животных, отнесённых в группу со спорной окраской (Q), по сравнению с группой «живых», может свидетельствовать о нехарактерной маркировке таксона в целом.

Исследованные представители планктона значительно отличались друг от друга размерами, внешними и внутренними особенностями строения, способами питания и размножения. По этой причине интенсивность окраски и её локализация были индивидуальны для каждого из таксонов. «Склонность» отдельных групп окрашиваться только одним красителем подтверждает целесообразность применения двух маркеров параллельно.

Анализ полученных данных показал, что представители только нескольких из исследованных таксонов подходят для витальной окраски двумя красителями – и ДФ, и НК (см. табл. 5.1.). В первую очередь можно выделить личинки многощетинковых червей – Polychaeta. Несмотря на то, что размер выборки недостаточно велик (21 особь – для ДФ, 20 – для НК), среди анализируемых организмов присутствовали ярко окрашенные черви (причём визуально яркость и насыщенность цвета соответствовала наблюдаемому ранее у модельной копеподы *Calanipeda aquaedulcis* [42, Литвинюк и др., 2009]) (рис. 5.1. – 18, 20), бесцветные организмы (см. рис. 5.1. – 19, 21), а также экземпляры со слабой окраской, которых относили к классу Q.

Положительные результаты получены для микропланктонных организмов типа Rotifera (предположительно, семействам Synchaeta). У большей части коловраток при окраске ДФ наблюдалось зелёное свечение всей поверхности тела в люминесцентном режиме микроскопа (см. рис. 5.1. – 17), тогда как при использовании НК часто отмечалась фрагментарная окраска, чаще всего, области желудка (см. рис. 5.1. – 16). Таких коловраток относили в группу спорноокрашенных Q, причём в процентном отношении их доля составила почти 78 %. Возможно, это связано с механизмом

действия маркера: как известно, НК окрашивает лизосомы клеток, а их количество, вероятно, наиболее велико в желудке. По сравнению с другими группами выборка данных по Rotifera была велика и составляла 558 (ДФ) и 138 (НК) экз., что может гарантировать достоверность полученных результатов.

Личинки брюхоногих моллюсков (Gastropoda) – представители меропланктона, имеющие тонкую известковую раковину (не препятствующую проникновению красителя), хорошо окрашивались обоими маркерами. При использовании НК у 13 из 20 особей наблюдался ярко красный цвет раковинки (см. рис. 5.1. – 41), 3 личинки были бесцветны, т. е. условно мертвы (см. рис. 5.1. – 38), и у 4 организмов окраска была слабовыраженной. Интенсивный цвет окрашенности личинок ДФ (см. рис. 5.1. – 40), наличие бесцветных (условно мертвых) экз. (см. рис. 5.1. – 39) и подвижных животных в классе Q дают основание предполагать возможную пригодность этого флуорохрома к окраске брюхоногих моллюсков.

У голопланктонного вида аппендикулярий – *Oikopleura dioica* – живые особи имели хорошо окрашенное туловище (ДФ, НК) (см. рис. 5.1. – 30, 31), тогда как хвост оставался бесцветным (или окрашивалась только его хорда). Независимо от степени окрашенности хвоста, особи с окрашенным туловищем относили к классу S (см. рис. 5.1. – 30). При использовании ДФ не встретили ни одной бесцветной, неокрашенной *O. dioica*, что не позволяет сделать однозначный вывод.

Во всём массиве обработанных данных присутствовало незначительное количество икринок пелагических рыб, однако все они были насыщенно окрашены и тем и другим красителем (см. рис. 5.1. – 25, 26). Это дает основания предположить, что эта группа может быть пригодна для окраски ДФ и НК, однако требуется больше данных для подтверждения этого результата.

Подотряд ветвистоусых ракообразных – Cladocera, представленный в черноморском зоопланктоне наиболее массово 4-мя видами, по видимому, не пригоден для окрашивания НК. Из 139 экземпляров видов *Penilia avirostris*, *Evadne spinifera* и *Pseudevadne tergestina* ни одна из кладоцер не была окрашена НК (см. рис. 5.1. – 2, 9, 11), хотя некоторые из них были подвижны. Только у вида *Pleopis polyphemoides* слабо выраженная окраска тела живых организмов чередовалась с достаточно яркой окраской яиц в выводковых камерах самок (см. рис. 5.1. – 5).

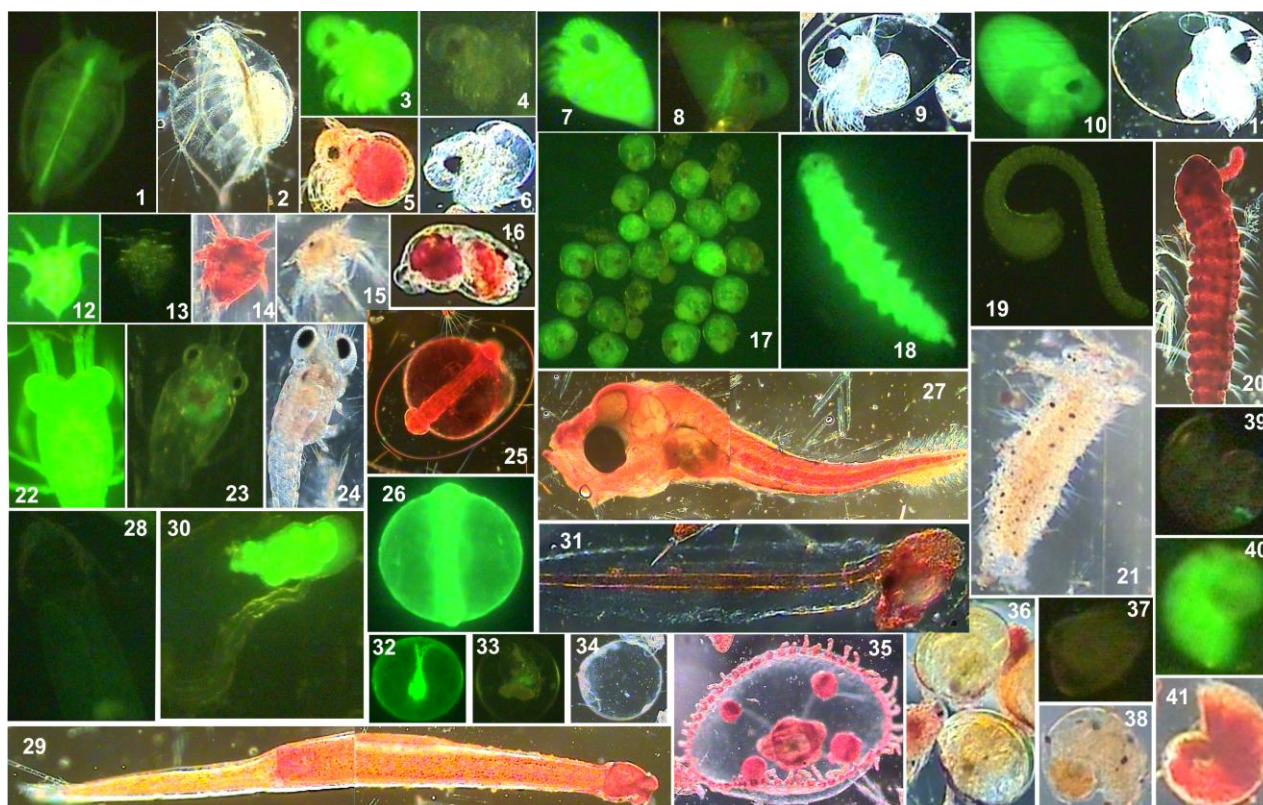


Рис. 5.1. Степень окраски организмов черноморского зоопланктона нейтральным красным и диацетатом флуоресцеина. 1 (ДФ), 2 (НК) – *Penilia avirostris*; 3, 4 (ДФ), 5, 6 (НК) – *Pleopis polyphemoides*; 7, 8 (ДФ), 9 (НК) – *Evadne spinifera*; 10 (ДФ), 11 (НК) – *Pseudevadne tergestina*; 12, 13 (ДФ), 14, 15 (НК) – nauplii Cirripedia; 16 (НК), 17 (ДФ) – Rotifera; 18, 19 (ДФ), 20, 21 (НК) – larvae Polychaeta; 22, 23 (ДФ), 24 (НК) – larvae Decapoda; 25 (НК), 26 (ДФ) – ova Pisces; 27 (НК) – larvae Pisces; 28 (ДФ), 29 (НК) – *Parasagitta setosa*; 30 (ДФ), 31 (НК) – *Oikopleura dioica*; 32, 33 (ДФ), 34 – *Noctiluca scintillans*; 35 (НК) – Hydromedusae; 36 (НК), 37 (ДФ), – larvae Bivalvia; 38, 41 (НК), 39, 40 – larvae Gastropoda; . Соотношение размеров разных таксонов на изображениях не соблюдены. Объяснения в тексте

Что касается окраски *Cladocera* диацетатом флуоресцеина, то её результаты указывают на возможность применения ДФ для работы с этой группой, по крайней мере, с некоторыми видами. Флуоресценция *P. polyphemoides* была яркой (см. рис. 5.1. – 3), однако доля особей этого вида с невыраженной окраской была велика (табл. 5.1.), а в редких случаях (5%) наблюдали подвижность неокрашенных организмов (см. рис. 5.1. – 4). Небольшой размер выборки *P. tergestina* и отсутствие неокрашенных («мёртвых») особей *E. spinifera* не позволяют однозначно сделать вывод по данным видам, однако их живые экземпляры имели хорошо выраженную ярко зелёную окраску всей поверхности тела (см. рис. 5.1. – 7, 10). Только 2 живые особи *P. avirostris* имели яркую окраску всего тела, у остальных – светился только пищеварительный канал, поэтому они были отнесены к классу Q (см. рис. 5.1. – 1).

Оба маркера интенсивно окрашивали плавающих личинок усоногих раков (Cirripedia) – массовых представителей черноморского меропланктона (см. рис. 5.1. – 12, 14). Присутствие в пробах неокрашенных организмов, (см. рис. 5.1. – 13, 15) наряду с окрашенными, при больших размерах исследованных выборок (соответственно, 211 и 63 экз. для НК и ДФ, табл. 5.1) указывают на пригодность этой группы организмов для окраски, хотя доля особей со слабо выраженной окраской ДФ была достаточно велика – до 49%.

Размер выборки *Parasagitta setosa* – крупного представителя типа щетинкочелюстных, был мал (8 экз. – НК, 3 экз. – ДФ). Часть организмов хорошо окрашивалась НК, они имели полностью окрашенное тело (см. рис. 5.1. – 29), другие имели только ярко-красную окраску головы и брюшного ганглия (и поэтому относились к Q). При использовании ДФ ни у одного экземпляра данного вида не наблюдалось выразительного цвета (см. рис. 5.1. – 28). Таким образом, можно ожидать, что, по крайней мере, НК может

быть пригоден для исследования этого вида, однако требуется больший объем материала для окончательного заключения.

Личинки десятиногих раков (Decapoda) встречаются в планктонных пробах достаточно редко. Из 4 проанализированных экземпляров, окрашенных ДФ, 3 имели очень яркое свечение (см. рис. 5.1. – 22, 23). Этот факт позволяет предположить, что маркер может подойти для данной группы. По НК данные практически отсутствуют как для larvae Decapoda, так и для гетеротрофной динофлагелляты *Noctiluca scintillans*. Единичные особи представлены на рис. 5.1 (см. рис. 5.1. – 34). Почти в 90 % случаев ночесветки не окрашивались и диацетатом флуоресцеина (см. рис. 5.1. – 32, 33).

Ни один из применяемых маркеров не окрашивал личинок двустворчатых моллюсков (Bivalvia) (см. рис. 5.1. – 36, 37). Вероятнее всего, красители не проникали в ткани из-за плотной структуры раковин.

Количество фотоснимков личинок рыб и планул гидромедуз, окрашенных НК, было невелико, но они отражали ту характерную окраску, которая свойственна другим организмам в ранее обрабатываемых пробах. Студенистое, почти стекловидно-прозрачное тело гидроидных медуз оставалось, как правило, бесцветным, за исключением выразительно окрашенных щупальца и ротового хоботка (см. рис. 5.1. – 35). Личинки рыб имели ярко-красный оттенок всего тела (см. рис. 5.1. – 27).

Существует дефицит литературных данных по применению НК в исследованиях неcopepodного зоопланктона и механизмам действия этого красителя [81, Crippen, Perrier, 1974; 118, Tang et al., 2006; 130, Tang et al., 2014]. На зоопланктонных организмах диацетат флуоресцеина применён нами впервые [42, 43, Литвинюк и др., 2009, 2011], ранее все гидробиологические исследования с использованием этого маркера проводились преимущественно на фитопланктоне [105, Onji et al., 2000]. Первые исследования неcopepodного зоопланктона с применением НК проводились в 1970-х гг. [81, Crippen, Perrier, 1974]; при этом определено

оптимальное время окраски яиц и личинок Polychaeta, яиц брюхоногих моллюсков *Littorina littorea* (Gastropoda), larvae Hydromedusae, коловраток (Synchaeta sp. и других неопределённых видов) и хетогнат (щетинкочелюстных), составившее по продолжительности 1 час. Более длительная окраска (до 3, 6 часов) была необходима личинкам Cirripedia, Decapoda и Bivalvia, хотя по данным других авторов личинки Cirripedia и Polychaeta не окрашивались НК [118, Tang et al., 2006]. Разницу в окраске НК различных таксонов авторы связывали с её продолжительностью. В наших исследованиях время окраски составляло от 20 мин. до нескольких часов. Однако, двустворчатые моллюски (Bivalvia) не были окрашены ни в одном эксперименте, тогда как личинки Cirripedia имели достаточно насыщенный цвет спустя 45 мин с момента начала окраски. Можно предположить, что такие расхождения результатов, полученных разными авторами, обусловлены малым объемом исследованных выборок организмов. Что касается применения ДФ, то данные, опубликованные в настоящей работе, были получены впервые.

РАЗДЕЛ 6

**ДИНАМИКА ДОЛИ ЖИВЫХ СОРЕРОДА В ПЛАНКТОНЕ
СЕВАСТОПОЛЬСКОЙ БУХТЫ И СОПРЕДЕЛЬНЫХ ВОДАХ В 2010 –
2011 ГГ.**

За период наблюдений с октября 2010 г. по октябрь 2011 г. средняя численность мезозоопланктона в бухте (ст. 3) была существенно выше, чем в сопредельных водах (ст. 1) – 35360,5 и 9780 экз. м⁻³, соответственно (рис. 6.1, верхние графики). Максимумы общей численности мезозоопланктона на станциях в бухте (96843 экз. м⁻³) и в сопредельных водах (26790 экз. м⁻³) зафиксированы в мае 2011 г., минимумы – в феврале 2011 на ст. 3 (6980 экз. м⁻³) и в октябре 2011 гг. на ст. 1 (1917 экз. м⁻³).

Наиболее массовой группой зоопланктонных организмов на обеих станциях были копеподы (рис. 6.1). На ст. 1 их вклад в общую численность мезозоопланктона составлял меньше 60 % только в мае – июне 2011 г., когда происходило массовое развитие гетеротрофной динофлагеллаты *Noctiluca scintillans*. На ст. 3 копеподы доминировали в течение всего периода исследований (за исключением весенних месяцев 2011 г.), нередко составляя более 90 % общей численности мезозоопланктона. В марте – мае 2011 г. на ст. 3 наблюдали массовое развитие меропланктонных науплиев Cirripedia. В мае 2011 г. наибольший вклад в общую численность мезозоопланктона внесли *N. scintillans* и кладоцера *Pleopis polyphemoides*.

Копеподы были представлены каляноидами *Acartia clausi*, *A. tonsa*, *Calanus euxinus*, *Centropages ponticus*, *Paracalanus parvus*, *Pseudocalanus elongatus*, циклопоидами *O. davisae* и *O. similis*. Структуры сообществ копепод в сопредельных водах и в кутовой части бухты существенно отличались. Численность вселенца *O. davisae* в сопредельных водах не превышала нескольких тысяч экз. в м³ с октября 2010 по январь 2011 гг. и

нескольких сотен экз. в м^3 с февраля по октябрь 2011 г. (рис. 6.2., верхние графики).

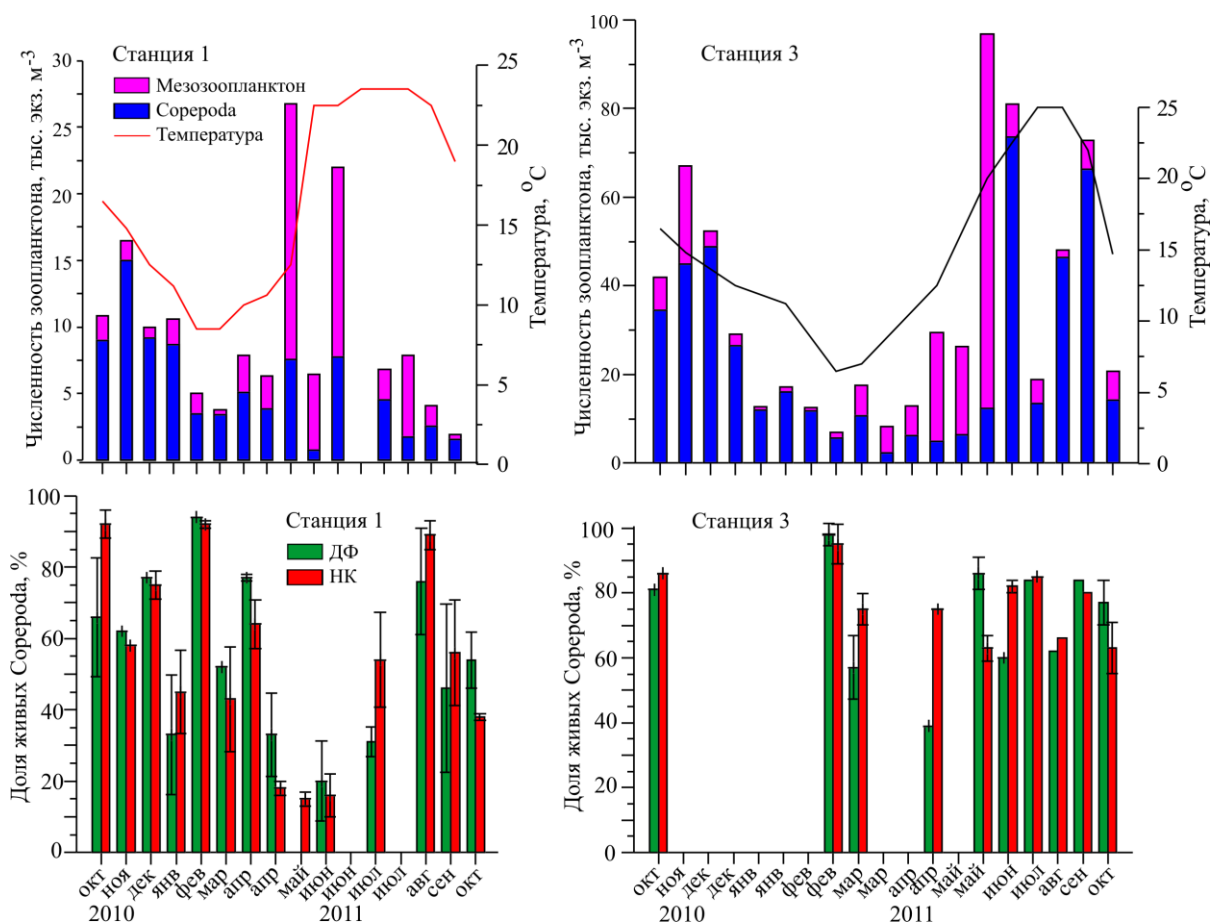


Рис.6.1. Сезонная динамика численности (верхние графики) и ДЖО (нижние графики) сообщества копепод

Вид отсутствовал в пробе в мае 2011 г. В кутовой части бухты численность вселенца была очень высокой, начиная с осени и до середины зимы 2010 г. (в декабре – 46556 экз. м^{-3}). С января по май 2011 г. численность *O. davisae* не превышала 10 тыс. экз. м^{-3} (с минимумом в мае – 644 экз. м^{-3}). В июне 2011 гг. был зафиксирован максимум численности вида за весь период наблюдений – 72600 экз. м^{-3} (см. рис. 6.2). Соответственно и вклад *O. davisae* в общую численность копепод на ст. 1 оставался ниже 50 %, тогда как в пробах, собранных на ст. 3, превышал 90 %. Одним из доминирующих

по численности видов копепод на ст. 1 был *P. parvus*. На ст. 3 виды рода *Acartia*, *P. parvus* и *P. elongatus* достигали численности свыше 1000 экз./м³.

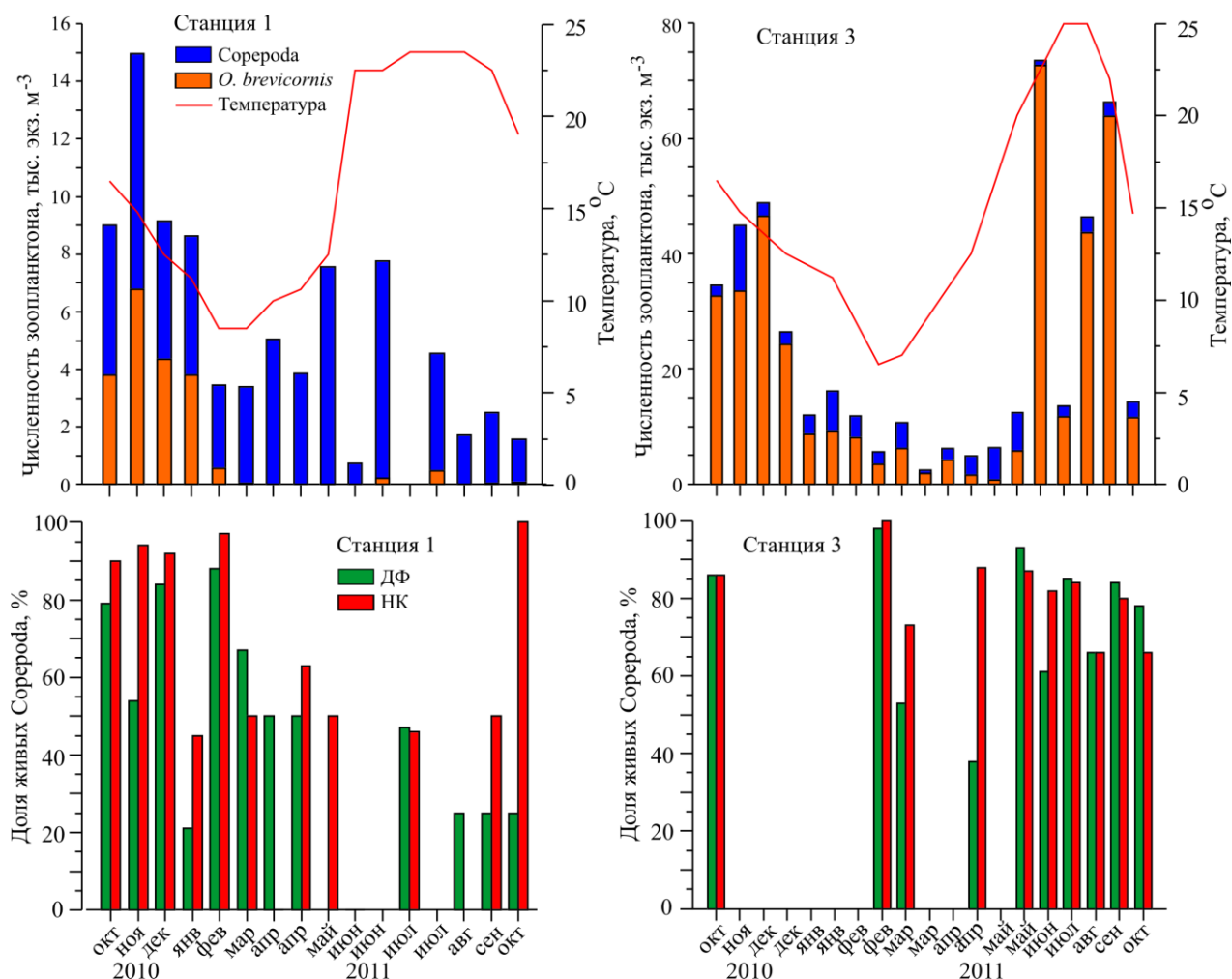


Рис. 6.2. Сезонная динамика численности (верхние графики) и ДЖО (нижние графики) *O. davisae*

Величинам ДЖО, полученным на обеих станциях двумя красителями, была свойственна высокая вариабельность – значения менялись в диапазоне от 15 до 98 % (рис. 6.1., нижние графики). В открытых водах на ст. 1 выявлен сезонный тренд с хорошо заметной тенденцией снижения ДЖО в сообществе копепод от холодных (около 70 %) к тёплым месяцам (около 15%) с отдельными эпизодами их роста до 80 – 90 % в феврале и апреле 2011 г. (рис. 6.1). С конца лета к осенним месяцам вновь наблюдали увеличение ДЖО. Эти результаты хорошо согласуются с полученными в

районе Одессы (1963-1965 гг.) данными Л.М. Зелезинской, которая отмечала, что общее количество осевших в планктонный осадкомер трупов планктёров возрастает от весны к лету и убывает от лета к осени [с. 19-20, 25]. При этом общая численность копепод на станции 1 изменялась в небольшом диапазоне (до 10 тыс. экз. м⁻³), а сезонный тренд был выражен слабо. Корреляционный анализ не выявил достоверной связи ДЖО с численностью копепод. В тёплые месяцы вклад копепод в общую численность мезозoopланктона снижался вследствие развития *N. scintillans*.

Подобного сезонного тренда ДЖО не выявлено в бухте на ст. 3, однако анализ основывается на неполной серии данных (рис. 6.1.). В водах бухты величины расхождения результатов по НК и ДФ были максимальны, особенно в весенний период. В марте и апреле 2011 г., когда общая численность копепод и их вклад в сообщество мезозoopланктона были минимальны, ДФ показывал низкие значения ДЖО (около 40 – 60 %). Однако в мае 2011 г. при массовом развитии *N. scintillans* и *P. polyphemoides* в мезозoopланктоне ДЖО копепод оставалась высокой (рис. 6.1).

Результаты анализа ДЖО в популяции *O. davisae*, в целом, согласуются с описанными выше, но снижение величин в весенний период на ст. 1 менее выражено (рис. 6.2). Тем не менее, корреляционный анализ этих данных показал наличие статистически значимой ($p < 0,05$) положительной связи между долей живых *O. davisae* и долей копепод в общей численности мезозoopланктона (0,68 и 0,67, соответственно для ДФ и НК). Как указывалось выше, вклад копепод в общую численность мезозoopланктона снижался в результате активного развития ноктилюки. Пищевой спектр этого организма достаточно широк и включает как бактерии, так и фитопланктон (диатомовые, динофлагелляты, см. например [37]), т.е. ноктилюка и планктонные копеподы утилизируют сходные пищевые ресурсы. Конкурентные отношения внутри сообщества, на наш

взгляд, могли бы служить одним из объяснений снижения ДЖО на ст. 1 в тёплые месяцы.

Поскольку для ст. 3 были получены лишь фрагментарные данные, сравнительный анализ открытого побережья (ст. 1) и вод бухты (ст. 3) по величинам ДЖО оказался возможным лишь для выборочных промежутков времени – октября 2010 г., с февраля по апрель, и с июня по октябрь 2011 г. В этой серии данных значения ДЖО были ниже в открытых водах (55 ± 22 против 73 ± 18 % по ДФ и 54 ± 27 против 77 ± 11 % по НК, указаны станд. откл.). Парный t-тест показал, что эти различия достоверны ($p = 0,025$ для ДФ и $0,005$ для НК). Если исходить из предположения, что в более эвтрофированных и загрязнённых водах смертность организмов выше, можно было бы ожидать обратного соотношения.

При прочих равных условиях смещение баланса в сторону увеличения ДЖО могло быть связано с более высокой скоростью разложения мертвых организмов. Действительно, можно ожидать, что в водах бухты с намного более высокой численностью и активностью бактериопланктона, средняя скорость разложения копепод в столбе воды выше, нежели в открытом море, однако это предположение требует экспериментальной проверки.

Для всей совокупности данных корреляция между оценками ДЖО, полученными с помощью НК и ДФ, была велика и составляла 0,77 (статистически значима, $p < 0.05$). Характер связи между этими величинами хорошо иллюстрирует рис. 6.3. – множитель при аргументе в регрессионном уравнении близок к единице. Вместе с тем, разброс точек велик, а расхождения в результатах применения разных маркеров существенны: в некоторых случаях они достигали 36 % ДЖО (в среднем $11,72 \pm 9,57\%$, станд. откл.).

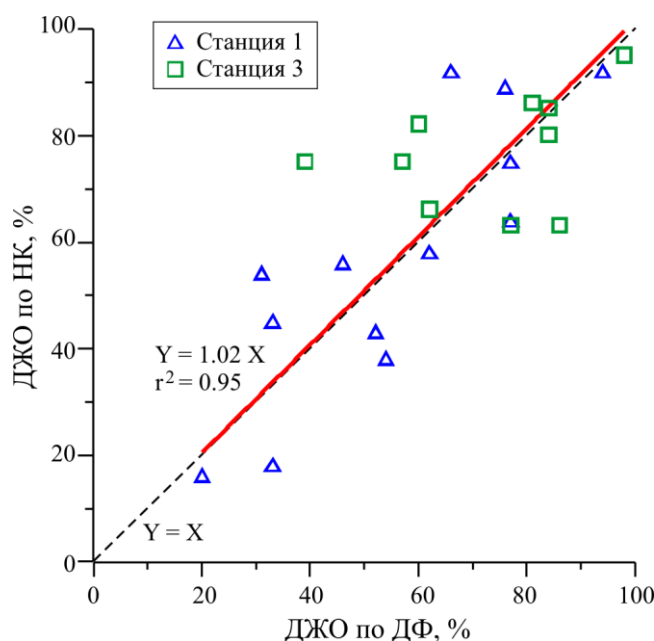


Рис. 6.3. Соотношение оценок ДЖО, полученных с помощью НК и ДФ

На наш взгляд, некорректно оценивать пригодность ДФ и потенциал его применения в качестве витального маркера по результатам окраски тех же проб НК. В первую очередь, из-за несовершенства самого НК – в некоторых случаях он может окрашивать до 4% мёртвых особей [118, *Tang et al.*, 2006]. Кроме того, в проводимых ранее экспериментах с модельной культурой копепод [42, Литвинюк и др., 2009] ДФ давал достоверные и воспроизводимые результаты. Можно предположить, что наблюдаемые расхождения между результатами окраски НК и ДФ могут быть связаны с разной природой действия красителей. Если механизм окраски ДФ ясен (внутриклеточная активность ферментов группы эстераз), то физиологическое действие НК (лизосомы клеток) не вполне понятно, несмотря на то, что этот витальный маркер применяется давно и широко [83, *Dressel et al.*, 1972; 85, 86, *Elliott, Tang*, 2009, 2011; 117, *Tang et al.*, 2006]. Вероятно, точность определения ДЖО с помощью ДФ более высока из-за быстрой остановки ферментативных процессов в клетках погибших животных.

В любом случае, комбинирование двух красителей, несмотря на громоздкость этого подхода, может дать ценную дополнительную информацию о состоянии исследуемого сообщества. Можно предположить, что наибольшие расхождения в результатах для НК и ДФ должны быть получены для погибающих или недавно погибших особей. В ходе анализа, по крайней мере, часть из них классифицируются как организмы со спорной окраской (класс Q). Следовательно, должна существовать связь между долей организмов в классе Q и величиной расхождения в результатах, полученных с помощью НК и ДФ. Действительно, зависимость между этими переменными оказалась хорошо выраженной при окраске ДФ (рис. 6.4, коэффициент детерминации регрессии $r^2 = 0,6$), и слабо выраженной – при окраске НК ($r^2 = 0,05$). Этот результат свидетельствует о большей «чувствительности» ДФ в определении момента смерти организмов.

Если исходить из того, что численность особей «в процессе умирания» (погибающих и только что погибших) пропорциональна скорости смертности, то величина расхождения в ДЖО по НК и ДФ может служить показателем смертности как процесса. Проверка этой гипотезы требует дополнительных экспериментальных исследований. Если она окажется верна, откроется перспектива экспресс-оценки смертности зоопланктона путём комбинирования двух маркеров физиологического состояния организмов. Однако, стоит отметить, что процесс отбора проб, как и прочие манипуляции (сгущение, концентрирование и т.п.) может оказывать негативное влияние на физиологическое состояние отлавливаемых гидробионтов, а в редких случаях даже приводить к их гибели.

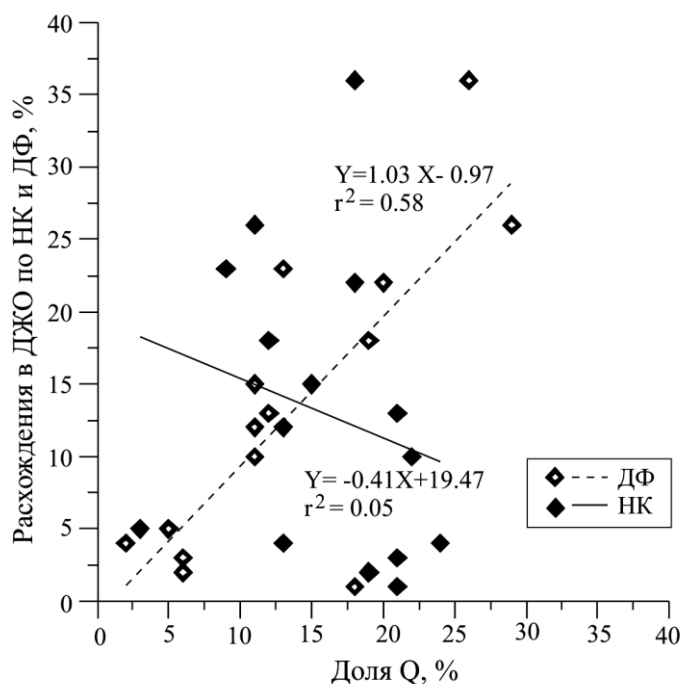


Рис. 6.4. Зависимость расхождений в оценках ДЖО по НК и ДФ от доли особей со спорной окраской Q

На рис. 6.5. представлена сезонная динамика величин расхождения в оценке ДЖО по двум красителям: $\Delta\text{ДЖО} = \text{ДЖО}_{\text{ДФ}} - \text{ДЖО}_{\text{НК}}$. Максимальные $\Delta\text{ДЖО}$ наблюдали в бухте (станция 3) в весенние месяцы; на станции 1 в открытом море – весной и в конце лета-начале осени. Наиболее полный временной ряд данных, полученный на станции 1 (рис. 6.5), позволил выявить цикличность изменений $\Delta\text{ДЖО}$ от положительных ($\text{ДЖО}_{\text{ДФ}} > \text{ДЖО}_{\text{НК}}$) к отрицательным величинам ($\text{ДЖО}_{\text{ДФ}} < \text{ДЖО}_{\text{НК}}$) и обратно с периодом около полугода. Хотя причины подобной сезонной динамики $\Delta\text{ДЖО}$ остаются невыясненными, её хорошо выраженная цикличность указывает на то, что изменения не носят случайный характер, т.е. не могут быть обусловлены только лишь погрешностью измерений ДЖО каждым из методов окраски.

Если рассматривать величину $\Delta\text{ДЖО}$ в качестве показателя скорости смертности зоопланктона, то максимальная смертность была зарегистрирована на станции в бухте. Подобная интерпретация $\Delta\text{ДЖО}$

хорошо согласуется с пониманием состояния морской экосистемы в целом – в более загрязнённых водах смертность копепод в среднем выше и её скорость возрастает в весенние месяцы, когда ухудшается общее санитарное состояние вод бухты, нарастает масштаб трофических процессов в ней. Это дает надежду на применение подобного подхода в будущем, но одновременно требует проведения дополнительного методологического исследования, в котором оценки $\Delta\text{ДЖО}$ сравнивались бы с результатами применения стандартных методов определения скорости элиминации (смертности) зоопланктона *in situ* с помощью седиментационных ловушек [84, Dubovskaya, 2008] или по численному соотношению возрастных стадий копепод [87, Elliott, Tang, 2011].

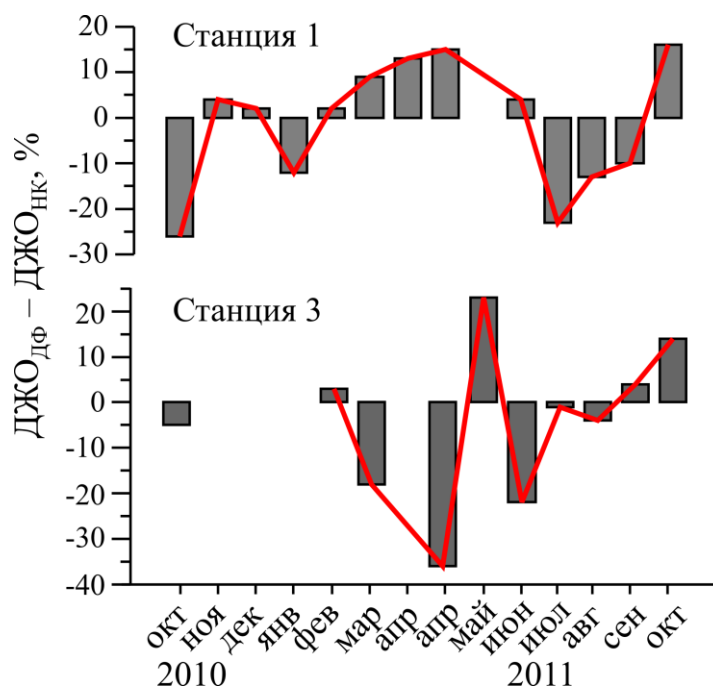


Рис. 6.5. Сезонная динамика величин расхождений в оценках ДЖО по ДФ и НК на станциях в открытом море (1) и бухте (3)

Сравнение величин ДЖО, полученных для морского зоопланктона в нашем исследовании, с аналогичными данными из разных районов Мирового океана затруднено из-за исключительно высокой вариабельности этого показателя. Диапазон его изменений широк – от 10 до 100 % (см.

обзоры [87, *Elliott, Tang, 2011*; 130, *Tang et al., 2014*]). Наши данные (15 – 98 %) почти полностью его перекрывают, несмотря на то, что получены они для ограниченного района и периода исследований.

По результатам многолетнего (1998 – 2006 гг.) исследования некрозоопланктона севастопольских бухт [51, *Павлова, Мельникова, 2011*], среднегодовые величины ДЖО зоопланктона составляли от 51 до 93%, причём в сильно загрязнённой Южной бухте значения были ниже, чем на более благополучной в этом отношении станции на выходе из Севастопольской бухты. Наши средние ДЖО, рассчитанные для всего периода исследования, лежат в пределах указанного диапазона (ст. 1: $55,5 \pm 12$ % ДФ, $n=13$, 54 ± 14 % НК, $n=14$; ст. 3: 72 ± 11 % ДФ, 77 ± 7 % НК, $n=10$, указ. дов. инт.). Однако, как указывалось выше, мы получили обратное соотношение ДЖО в относительно грязных и чистых водах.

Нерегулярные отборы проб и отсутствие данных о численности сетного зоопланктона в кутовой части б. Южная, одном из самых загрязнённых районов Севастопольской бухты [39, *Копытов и др.*; 67, *Павлова и др. 1999*], не позволили в полной мере оценить состояние популяции копепод в этой акватории. Долю живых организмов измеряли только с июля по сентябрь и в декабре 2010 г. Процентный вклад живых *Soropoda* в их общую численность составлял не менее 60% во всех пробах, а в большинстве случаев – превышал 80% (рис. 6.6). Как и в других районах Севастопольской бухты, существенный вклад в общую численность сообщества копепод вносила копепода-вселенец *O. davisae*. В целом, результаты, полученные для б. Южной, подтверждают вывод о росте ДЖО в более загрязнённых и эвтрофированных водах.

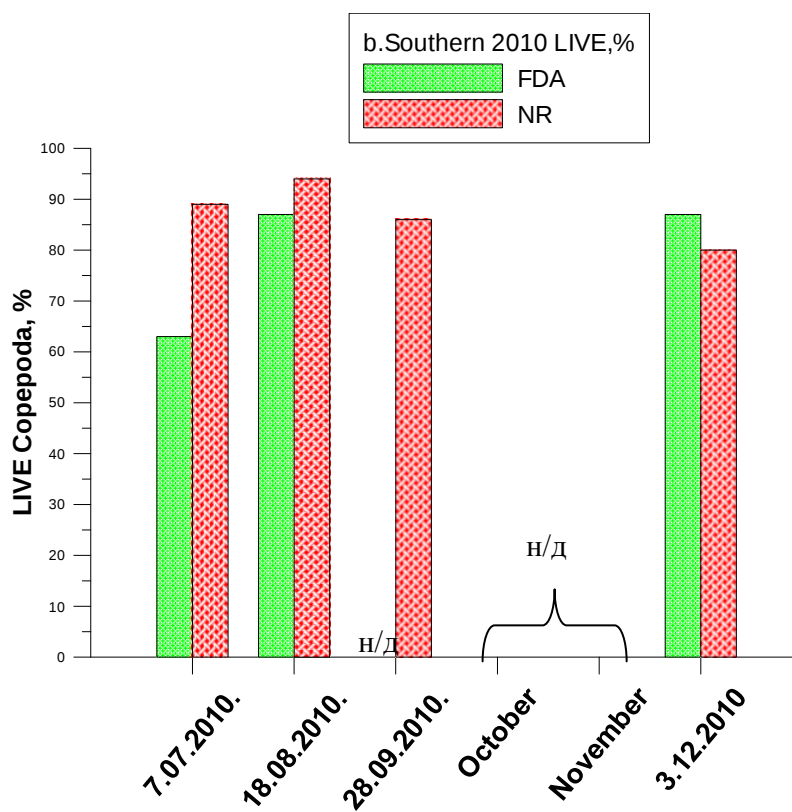


Рис. 6.6. – Доля живых Соперода в б. Южная 0-6 м. 2010 г.

РАЗДЕЛ 7

СООТНОШЕНИЕ ЖИВОЙ И МЁРТВОЙ КОМПОНЕНТ СООБЩЕСТВА ЗООПЛАНКТОНА В ВОДАХ С РАЗНЫМ ГИДРОЛОГО-ГИДРОХИМИЧЕСКИМ РЕЖИМОМ (ЭКСПЕРИМЕНТ IX)

Сравнение станций в бухте (ст. 3) и сопредельных водах (ст. 1) по величинам ДЖО было затруднено тем, что временной ряд, полученный для ст. 3, был неполным. Поэтому для анализа были выбраны только те периоды времени, в которые собирали данные на обеих станциях. Средние величины ДЖО, полученные в эти периоды с помощью обоих красителей, были достоверно выше в бухте (ст. 3), которая подвержена наибольшему антропогенному загрязнению (рис. 7.1). Как указывалось выше, этот результат находится в противоречии с наблюдениями других авторов (например, [50, Павлова, Мельниова, 2006; 53, Павлова, Лесецкая, 2009]), которые отмечали рост доли мертвого зоопланктона в более эвтрофированных и загрязненных водах. Вывод о росте смертности организмов в неблагоприятных условиях был ожидаем и не вызывал сомнений, однако при этом не учитывалось, что результатом высокой смертности и, соответственно, низких величин ДЖО, должны были быть низкие общие численности организмов на протяжении достаточно продолжительных промежутков времени. Как правило, в прибрежных водах (подверженных наибольшему загрязнению) среднегодовые численности зоопланктона выше, чем в открытых водах, что связано с их высоким уровнем трофности. Этот очевидный факт, к сожалению, игнорируется при интерпретации данных о смертности зоопланктона в водах с разным уровнем антропогенного загрязнения.

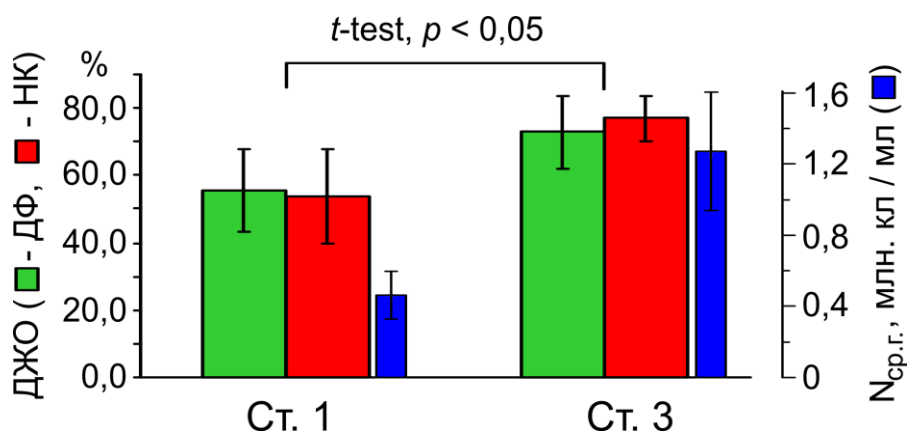


Рис. 7.1. Средние значения ДЖО и численности бактериопланктона ($N_{ср.г.}$) в 2010 – 2011 гг. на станциях 1 (2 мили) и 3 (Сухарная балка) (Литвинюк, Муханов, неопубл.)

Как отмечалось выше (раздел 6), среднегодовые численности зоопланктона и его отдельных таксонов на станциях в бухте были значительно выше, чем в открытых водах, и, следовательно, баланс приход/расход в сообществе был смещен в сторону процессов воспроизводства. Лишь на основе данных об общей численности можно утверждать, что зоопланктон «чувствовал себя» лучше в водах бухты, несмотря на их интенсивное загрязнение.

Интерпретация результатов, полученных по величинам ДЖО, требует понимания того, как формируется и поддерживается пул мертвых организмов в сообществе. Смертность организмов, связанная с их выеданием хищниками, должна быть исключена из анализа, поскольку организмы изымаются из среды и разрушаются в процессе питания или переваривания, т.е. выедание не ведет к формированию пула мертвых организмов в столбе воды. Кроме того, можно предположить, что влияние процессов выедания на численность мертвых и живых организмов одинаково (отсутствие селективности питания). Пул мертвых организмов формируется в результате их естественной смертности вследствие достаточно широкого круга причин (возраст, нарушения в развитии, инфекции, воздействие токсикантов и др. (см. п. 1.3)) [18, Дубовская, 2009].

Статья «расхода» пула формируется за счет изъятия мертвых организмов из столба воды в результате процессов седиментации [25, *Зелезинская*, 1966; 38, *Коваль*, 1984; 74, *Черепанов, Павлова*, 2008; 96, *Hirst, Kiørboe*, 2002], а также вследствие процессов разложения и разрушения мертвых организмов [87, *Elliott, Tang*, 2011; 101, 116, *Tang et al.*, 2010, 2012,]. В свою очередь, скорость разложения мертвого зоопланктона определяется интенсивностью микробной активности в пелагиали, которая зависит, в первую очередь, от численности гетеротрофного бактериопланктона и температурных условий.

Хотя скорости седиментации органической взвеси достаточно хорошо изучены в Чёрном море [33, *Гулин и др.*, 1995; 61, *Самышев*, 2009; 121, *Dzitsky et al.*, 2012,] интерпритировать эти данные на Севастопольскую бухту (ст.3) и открытые воды за ее пределами сложно. Можно лишь предположить, что в открытых водах (ст.1) в условиях более интенсивного турбулентного перемешивания скорость седиментации детрита была ниже, чем в бухте. Следствием этого могли бы быть более высокие ДЖО в водах бухты, однако подобные предположения требуют экспериментальной проверки.

Среднегодовые численности бактериопланктона (*Муханов*, неопубл.) были значительно (в 2,5 раза) выше в бухте (рис. 7.1; достоверное отличие от величин в открытых водах – $p < 0,05$, t -тест). Хотя среднегодовые температуры воды на станциях 1 и 3 отличались незначительно, столь выраженные отличия в бактериальной численности могли служить одним из объяснений высоких значений ДЖО в водах бухты. Действительно, при одной и той же удельной скорости естественной смертности организмов (m) и прочих равных условиях (скоростей воспроизводства, выедания, седиментации) доля мертвых организмов будет тем ниже (а ДЖО – тем выше), чем выше скорость бактериального разложения мертвых организмов.

Чтобы проверить эту гипотезу, в эксперименте IX сравнивали скорости разложения мертвых копепод (из одной и той же культуры) в

морской воде, отобранной на ст. 1 и 3 (рис. 7.2). Начальные численности бактерий в пробах отличались в 3 раза и составляли, соответственно, $0,4$ (ст. 1) и $1,3 \times 10^6$ кл. мл⁻¹ (ст. 3). К 4-м суткам экспозиции проб *in situ* произошло полное разложение рачков (до последней стадии V, рис. 7.2), соответственно, 19,3% (ст. 1) и 43,4% (ст. 3) трупов копепод. Характер распределения численности копепод по стадиям разложения представлен на рис. 7.2. Рассчитанные по этим данным удельные скорости разложения мертвого зоопланктона составили, соответственно, $0,05$ (ст. 1) и $0,14$ сут⁻¹ (ст. 3), т.е. соотносились 1:3, как и бактериальные численности. Наличие прямой связи между скоростью разложения мертвого зоопланктона и бактериальной численностью в эксперименте свидетельствовало о том, что обилие и активность бактерий может служить одним из ключевых факторов, контролирующих размеры пула мертвых организмов *in situ*.

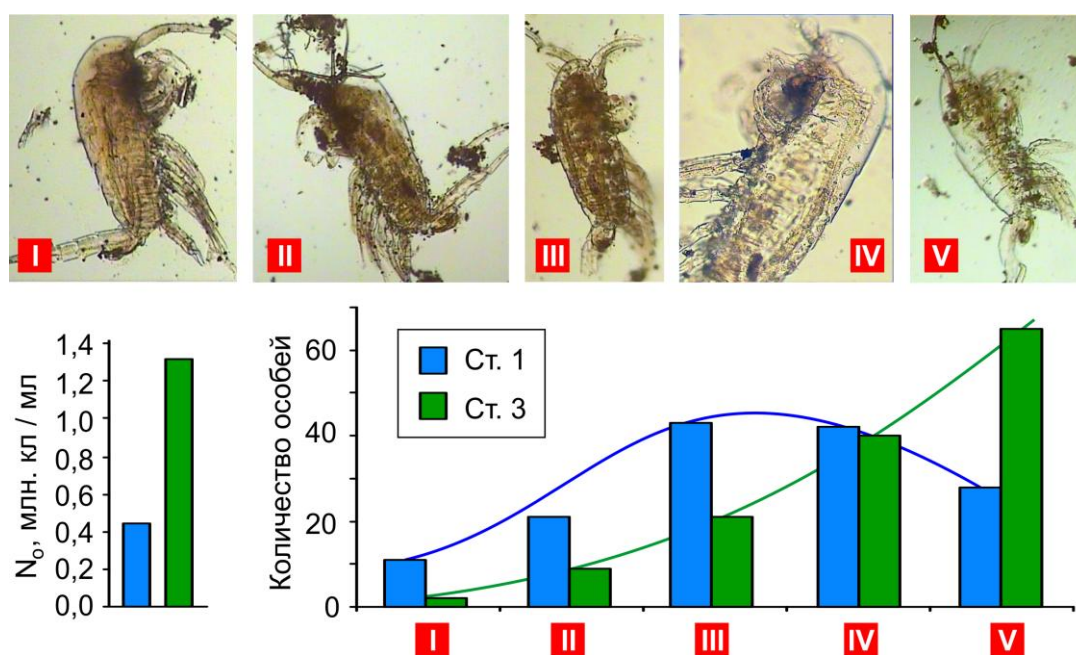


Рис. 7.2. Стадии разложения копепод (I-V) (фото сверху), начальные численности бактерий в эксперименте (N_0) (график слева) и соотношение численностей разных стадий разложения копепод на четвертые сутки (график справа)

В соответствии с микробиологическими данными (В.С. Муханов, неопубл.) станции 1 и 3 не отличались достоверно по среднегодовым величинам размеров бактериальных клеток и внутриклеточного содержания нуклеиновых кислот FL1 (рис. 7.3). Величина FL1 могла служить показателем физиологической активности отдельных клеток [75, Servais, 2003; 100, Lebaron *et al.*, 2001]. Соответственно, интегральную функциональную активность бактерий оценивали как произведение $FL1 \times N$, где N – численность бактериопланктона. Как по количественным показателям (численность, биомасса), так и по интегральной активности бактериопланктона, станции отличались достоверно, причем показатели вод бухты в 2,5-3 раза превышали таковые в сопредельных водах (рис. 7.3).

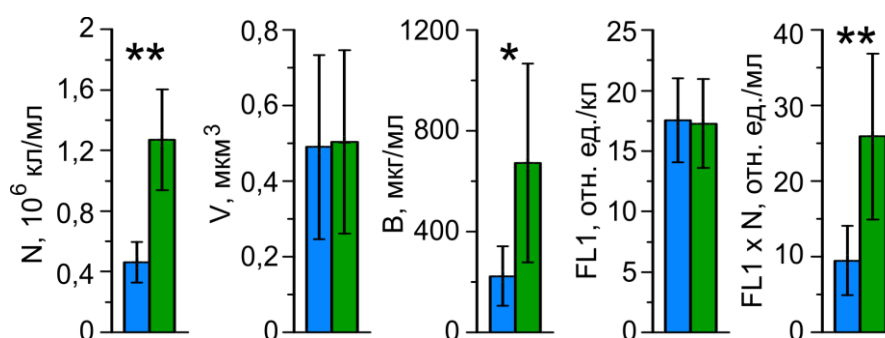


Рис. 7.3. Среднегодовые (2010 - 2011 гг.) бактериальные показатели ($\pm 95\%$ дов. инт.) на ст. 1 (голубой) и ст. 3 (зеленый): численность (N), объем клеток (V), биомасса (B), содержание нуклеиновых кислот в клетке ($FL1$), интегральная бактериальная активность ($FL1 \times N$). Отмечены достоверные отличия (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

Таким образом, результаты эксперимента и микробиологические данные позволяют предположить, что повышенные среднегодовые значения ДЖО зоопланктона в бухте могли быть, по крайней мере отчасти, обусловлены высокой численностью и активностью бактериопланктона и, соответственно, высокой скоростью разложения некрозоопланктона.

Зависимости между этими переменными, полученные на основе полевых данных, представлены на рис. 7.4.

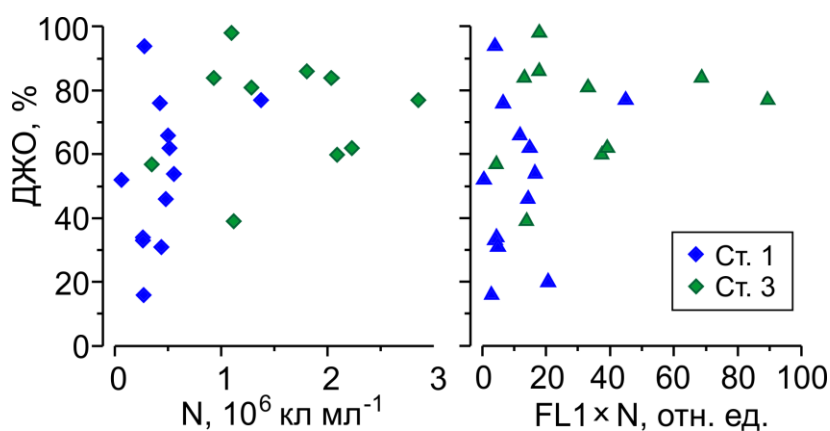


Рис. 7.4. Зависимость ДЖО в сообществе зоопланктона Севастопольской бухты (ст. 3) и открытого побережья (ст. 1) от численности (N) и интегральной активности (FL1×N) бактериопланктона

При высоких бактериальных численностях доля живого зоопланктона всегда была велика, при низких – наблюдали широкий диапазон изменчивости ДЖО, что могло быть связано с действием иных факторов – седиментации, выеданием детритофагами и др.

Упрощенная математическая модель динамики численности живых и мёртвых организмов в зоопланктоне, которую мы использовали в нашем исследовании (рис. 7.5, А), не учитывала процессы выедания и седиментации:

$$dN_L/dt = (\mu - m) \times N_L,$$

$$dN_D/dt = m \times N_L - d \times N_D,$$

где N_L – численность живых организмов, N_D – численность мертвых организмов, μ – удельная скорость роста, m – естественная смертность, d –

скорость разложения трупов. Величина N_L сохранялась неизменной во времени при условии $\mu = m$ (потери в результате естественной смертности полностью покрывались воспроизводством), что соответствовало некоторому стационарному состоянию сообщества (на исследуемых станциях – это среднегодовые, т.е. «равновесные» численности зоопланктона). При любых начальных значениях параметров N_L , m и d , величина ДЖО ($N_L/(N_L+N_D)$) зависела только от соотношения скоростей m и d (рис. 7.5, Б). Эта зависимость была использована для того, чтобы по средним значениям ДЖО, полученным на каждой из станций, определить соответствующие им величины d/m (см. рис. 7.5, Б). Последние оказались равны 1,2 и 3, соответственно, на ст. 1 и 3. Таким образом, на станции в открытых водах скорость разложения мертвых организмов была равна смертности живых организмов, тогда как в бухте она в 3 раза превышала смертность. Соотношение величин d/m на станциях 1 и 3 составляло около 1:3, как и в случае с численностями бактерий и скоростями разложения мертвых копепоид.

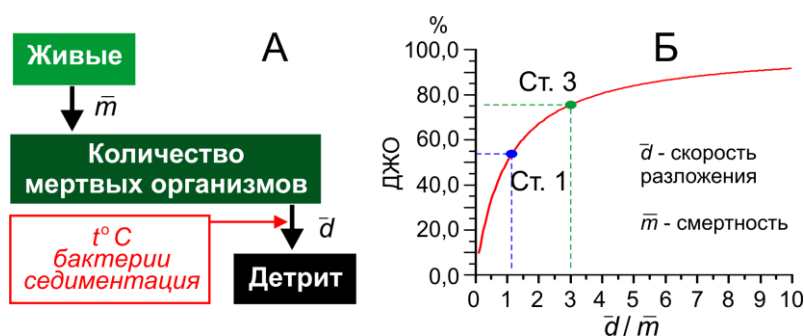


Рис. 7.5. А – Процессы, определяющие величину пула мертвого зоопланктона (смертность m и элиминация d), и факторы, контролирующие элиминацию трупов. Б – зависимость ДЖО от соотношения скоростей элиминации трупов и естественной смертности d/m в соответствии с упрощенной моделью

По экспериментальным оценкам скорости разложения копепоид d и модельным значениям d/m рассчитали средние величины естественной смертности зоопланктона в водах бухты и за её пределами. Они составили,

соответственно, 0,045 (ст. 1) и 0,047 сут⁻¹ (ст. 3), т.е. практически не отличались в водах с разным уровнем трофности и степенью антропогенного загрязнения. Полученные расчетным путем величины естественной смертности копепод были в пределах диапазона типичных значений (0,01-0,1 сут⁻¹), определяемых экспериментально другими авторами для взрослых копепод.

Поскольку в данной работе не рассматривались процессы седиментации, скорость элиминации трупов (переменная d в модели) могла быть в той или иной степени недооценена. Необходимо принимать во внимание и тот факт, что на станциях 1 и 3 облавливались разные слои – соответственно, 40-0 и 8-0 м. При равных скоростях седиментации время пребывания мёртвых организмов в столбе 0-40 м должно было превышать таковое в столбе 0-8 м, следствием чего могли быть завышение оценок ДЖО (в полевых данных) и недооценка скорости элиминации трупов (в модели) на мелководной станции в бухте.

Обобщая полученные модельные, экспериментальные и полевые данные, можно сделать заключение, что высокие показатели ДЖО зоопланктона в подверженных интенсивному загрязнению водах бухты не являлись свидетельством снижения смертности организмов и могли быть обусловлены а) обилием гетеротрофных бактерий и интенсивными процессами разложения мертвых организмов в детритной пищевой цепи, б) малым временем пребывания трупов в столбе воды. При этом величины естественной смертности копепод в бухте были, по крайней мере, не ниже, чем в открытых водах. Подобные наблюдения меняют устоявшееся представление о том, что в районах интенсивного загрязнения морских вод доля живых организмов в популяции или сообществе неизменно снижается в связи с увеличением их смертности. Наоборот, более высокий уровень трофности вод (который нередко является следствием загрязнения) предполагает интенсификацию процессов разложения детрита, уменьшение пула мертвых организмов и увеличение ДЖО.

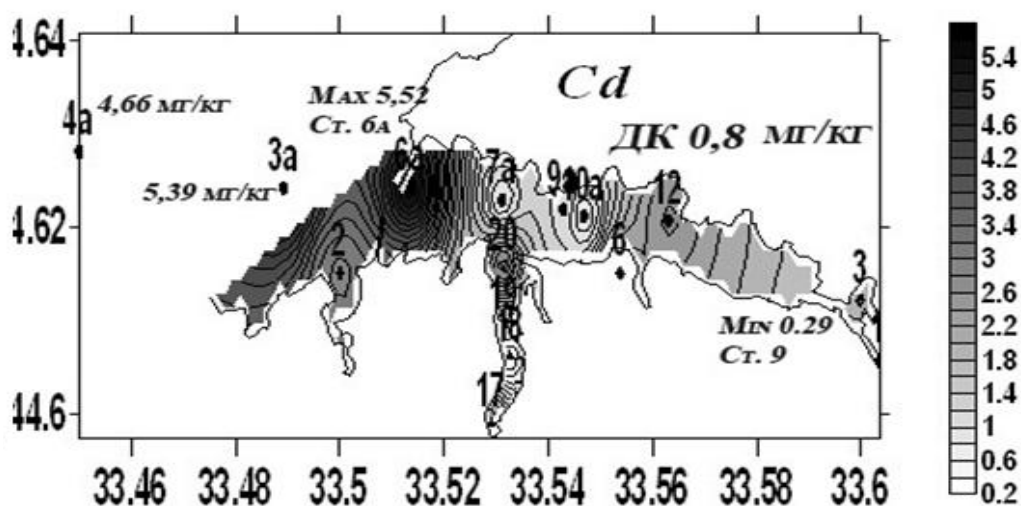


Рис. 7.6. Содержание кадмия в донных осадках в бухте и в прилегающей акватории в 2008 г. [по 39, *Копытов и др., 2010*]

В основу второго предположения, объясняющего высокие значения ДЖО в бухте, положены отличия акваторий по смертности копепод (входящему потоку m) (см. рис. 7.5. А). Современный характер распределения некрзоопланктона (в частности, копепод) в Севастопольской бухте и в прилегающих акваториях подтверждает вывод о существенном возрастании загрязнения бухты и сопредельных вод тяжелыми металлами и мышьяком в последние годы (рис. 7.6). Источник этого загрязнения – введенная в эксплуатацию в марте 2001 г. первая очередь полигона ТБО (городская свалка) в Первомайской балке в Инкермане [56, *Подбельцева, Лавриненко, 2011, эл. ресурс*]. Сопредельные воды загрязняются при выносе вод из бухты через ее жерло глубиной 15-20 м при преобладающих северных и северо-восточных ветрах (повторяемость 36%) [7, *Иванов и др., 2006*]. За пределами бухты происходит аккумуляция загрязнителей. Донные осадки взмучиваются, а ветровое волнение, приводит к постоянному вторичному загрязнению воды. Обнаруженная сезонная динамика ДЖО копепод на прилегающей к бухте акватории («2

мили» с глубиной 40 м) определяется, в основном, сезонной повторяемостью ветров северного и северо-восточного направления.

Обнаруженные вне бухты на глубине до 40 м высокие значения концентраций *Cu*, *Cd*, *Zn*, *Cr*, *Co* и *As* [39, Копытов и др., 2010] при поступлении поллютантов в воду могут достигать величин, которые являются токсичными по отношению к гидробионтам, особенно к таким «ранимым» объектам, как ракообразные и молодь рыб [41, Литвинюк, Минкина, 2012].

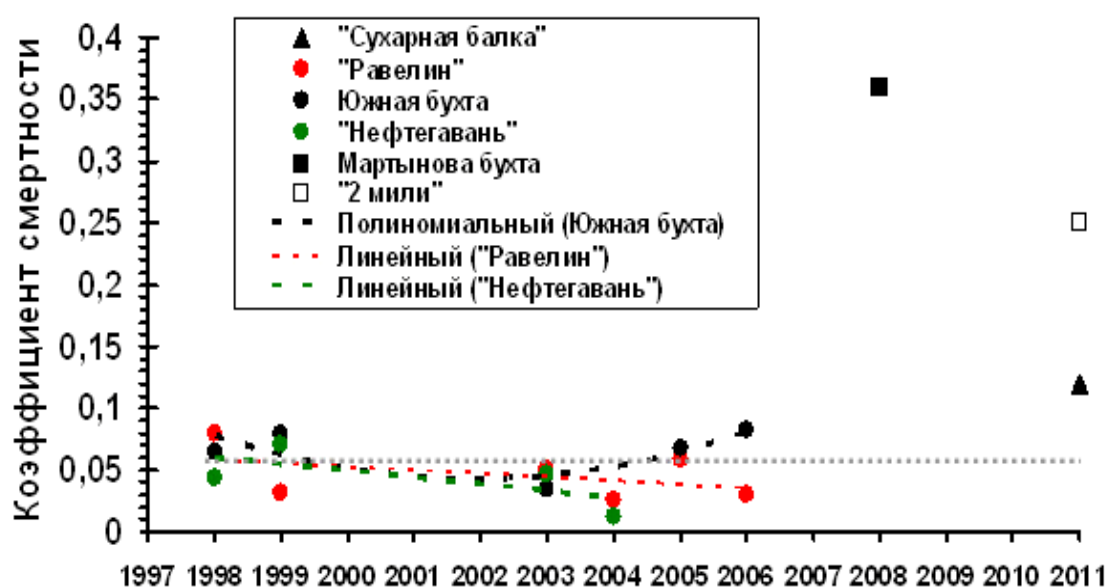


Рис. 7.7. Динамика коэффициентов смертности различных возрастных стадий группы Copepoda (в большей степени взрослых особей рода *Acartia* и всех копеподитных стадий прочих копепод) с 1998 по 2011 гг. в различных точках Севастопольской бухты и вне её (ст. «2 мили»). Горизонтальной точечной линией показан уровень коэффициента смертности *Acartia clausi* в открытой части моря вблизи г. Одессы в 1964 г. [29, Зелезинская, 1966]

Полученные нами среднегодовые величины ДЖО за 2011 г. позволяют продлить кривые динамики коэффициента смертности копепод в различных районах Севастопольского побережья, выявленную ранее О.А.

Черепановым (неопублик.). Коэффициент смертности представляет собой показатель степени экспоненты, определяя скорость этого процесса. Он рассчитывается по формуле [73, 74, Черепанов, Павлова, 2008]:

$$\beta = -\frac{1}{\tau} \ln \left(\frac{\bar{X}_{\tau}}{x_{\tau} + \bar{X}_{\tau}} \right)$$

где β – удельный коэффициент смертности организмов (сут.⁻¹); x_{τ} – количество особей (экз.·м⁻³), погибших за период τ (сут.) в единице объема воды; $\bar{X}_{\tau}$ – оценка средней плотности численности живых организмов за этот же период (экз.·м⁻³).

Показательна самая загрязненная акватория в Севастопольской бухте - б. Южная, где коэффициент смертности копепод снижался до 2003 г. и непрерывно возрастал в последующий период исследований.

Самый высокий коэффициент смертности копепод обнаружен в Мартыновой бухте в 2008 г. (0,36). В двух милях от устья Севастопольской бухты в 2010-2011 гг. наблюдалось резкое возрастание коэффициента смертности копепод до 0,25 (рис. 7.7) [41, Литвинюк, Минкина, 2012].

ВЫВОДЫ

1. Разработан и успешно апробирован в экспериментах с модельной культурой копепод и в полевом исследовании сообщества черноморского зоопланктона метод прижизненной окраски организмов зоопланктона диацетатом флуоресцеина (ДФ), который имеет ряд преимуществ перед традиционными витальными красителями - повышенную яркость и контрастность окраски, возможность применения современных методов микроскопирования (эпифлуоресцентной микроскопии), проточной цитометрии и визуализации.

2. Разработан и запатентован оригинальный метод измерения и статистического анализа цветовых характеристик организмов, окрашенных любым из витальных красителей, который унифицирует процедуру классификации организмов на живые и мёртвые и освобождает исследователя от необходимости принимать субъективные решения при проведении классификации. Совместное применение этого метода с ДФ в качестве витального красителя открывает перспективы автоматизации исследований жизнеспособности организмов зоопланктона и может быть востребовано не только в полевых исследованиях, но и биотехнологических разработках.

3. Оба красителя, ДФ и НК, могут успешно применяться в исследованиях следующих таксономических групп и таксонов зоопланктона: larvae Polychaeta, Gastropoda, Rotifera, Pisces ova, *Oikopleura dioica*, *Parasagitta setosa* и larvae Cirripedia. Отрицательный результат получен для larvae Bivalvia. НК не может применяться для окраски ветвистоусых ракообразных видов *Penilia avirostris*, *Evadne spinifera*, *Pseudevadne tergestina*, но его альтернативой в этих случаях может служить ДФ.

4. Сохранность проб зоопланктона, окрашенных ДФ, сроком до 2 недель достигается посредством «сухой» заморозки окрашенных

организмов после их осаждения на фильтр. Этот метод может быть использован в условиях морской экспедиции

5. В соответствии с результатами годовой съёмки зоопланктона Севастопольской бухты и сопредельных вод доля живых организмов (ДЖО) в сообществе копепод была достоверно выше (ст. 1: $55,5 \pm 12$ % ДФ, 54 ± 14 % НК; ст. 3: 72 ± 11 % ДФ, 77 ± 7 % НК, указ. дов. инт) в подверженных загрязнению водах бухты. Выдвинуто предположение, что, по крайней мере, одной из причин этого феномена могли быть высокая численность и активность бактериопланктона и, соответственно, более высокая скорость разложения мертвых организмов. Получено экспериментальное подтверждение этой гипотезы.

6. На основе экспериментальных данных и результатов имитационного моделирования выдвинуто предположение, что высокие величины ДЖО, наблюдаемые в подверженных загрязнению водах бухты, не означали при этом, что смертность зоопланктона в этом районе была ниже, чем в более благополучных с экологической точки зрения сопредельных прибрежных водах.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Акватории и берега Севастополя: экосистемные процессы и услуги обществу / под ред. Е.В. Павловой, Н.В. Шадрина. – Севастополь : Аквавита, 1999. – 289 с.
2. Александров Б.Г. Методика дифференцированного учёта живых и мёртвых организмов морского зоопланктона с помощью флуоресцентной микроскопии / Б.Г. Александров, О.А. Аблов // Экология моря. – 1991. – Вып. 37. – С. 89–93.
3. Алтухов Д.А. *Oithona brevicornis* Giesbrecht в Севастопольской бухте в октябре 2005 – марте 2006 гг. / Д.А. Алтухов, А.Д. Губанова // Мор. экол. журн. – 2006. – Т. 5, № 2. – С. 32.
4. Биология : большой энциклопедический словарь / под ред. М.С. Гилярова. – 3-е изд. - Москва : Большая Российская энциклопедия, 1999. – 864 с.
5. Гептнер М.В. Мертвые копеподы в планктоне: факты и гипотезы / М.В. Гептнер, А.Н. Заикин, Ю.А. Рудяков // Океанология. – 1990. – Т. 30, вып. 1. – С. 132–137.
6. Гидролого-гидрохимический режим Севастопольской бухты в условиях антропогенного воздействия (по наблюдениям 1998 – 1999 гг.) / Е.И. Овсяный, Р.Б. Кемп, Л.Н. Репетин, А.С. Романов // Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон и комплексное использование ресурсов шельфа : сб. науч. тр. / НАН Украины, Мор. гидрофиз. ин-т. – Севастополь, 2000. – С. 79–103.
7. Гидролого-гидрохимический режим Севастопольской бухты и его изменения под воздействием климатических и антропогенных факторов / В.А. Иванов, Е.И. Овсяный, Л.Н. Репетин, А.С. Романов. – Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2006. – 91 с.

8. Гладышев М.И. Живой и мертвый лимнический зоопланктон в верхнем и нижнем бьефах плотины Красноярской ГЭС / М.И. Гладышев, О.П. Дубовская, О.Н. Махутова // Докл. АН. – 2003. – Т. 390, № 4. – С. 571–573.
9. Гладышев М.И. Сезонная динамика удельной смертности *Bosmina longirostris* в лесном пруду, определённая на основе учёта мёртвых особей / М.И. Гладышев, В.Г. Губанов // Док. АН. – 1996. – Т. 348, № 1. – С. 127–128.
10. Гладышев М.И. Устройство для окрашивания организмов зоопланктона с целью дифференциации живых и мертвых особей в фиксированных пробах / М.И. Гладышев // Гидробиол. журн. – 1993. – Т. 29, № 2. – С. 94–97.
11. Грузов Л.Н. Исследование пространственно-временной структуры планктонных полей северной половины Чёрного моря в 1992–1993 гг. / Л.Н. Грузов, П.В. Люмкис, Г.В. Нападовский // Исследование экосистемы Чёрного моря. – Одесса, 1994. – Вып. 1. – С. 94–127.
12. Губарева Е.С. Солёностная толерантность копепод *Calanipeda aquaedulcis* и *Arctodiaptomus salinus* (Calanoida, Copepoda) / Е.С. Губарева, Л.С. Светличный // Мор. экол. журн. – 2011. – Т. 10, №4. – С. 32–39.
13. Дзицкий В.С. Компьютерная программа ImageRegionColor : а. с. 36639 / В.С. Дзицкий. — заявл. 21.01.2011.
14. Дзицкий В.С. Компьютерная программа для оценки цветовых характеристик окрашенных зоопланктонных организмов / В. С. Дзицкий // Понт Эвксинский VII : тез. докл. Междунар. науч.–прак. конф. по проблемам водных экосистем, посвящ. 140-летию Ин-та биологии юж. морей Нац. акад. наук Украины (Севастополь 24–27 мая 2011 г.). - Севастополь, 2011. – С. 98–99.
15. Динамика доли живых Copepoda в планктоне Севастопольской бухты и открытого побережья в 2010 – 2011 гг. / Д. А. Литвинюк, Д. А. Алтухов, В. С. Муханов, Е. В. Попова // Мор. экол. журн. – 2011. – Отд. вып., № 2. – С. 56–65.

16. Дубовская О.П. Вертикальное распределение живого и мертвого зоопланктона формирующегося Саяно-Шушенского водохранилища / О.П. Дубовская // Гидробиол. журн. – 1987. – Т. 23, № 6. – С. 84–88.
17. Дубовская О.П. Динамика живого и мертвого зоопланктона в малом водохранилище бассейна Енисея / О.П. Дубовская // Вестн. Красноярского гос. ун-та. Естеств. науки. – [2006]. – 2005, вып. 5. – С. 161–168.
18. Дубовская О.П. Не связанная с хищниками смертность планктонных ракообразных, её возможные причины (обзор литературы) / О.П. Дубовская // Журн. общ. биол. – 2009. – Т. 70, № 2. – С. 162–185.
19. Дубовская О.П. Оценка количества мертвых особей рачкового зоопланктона в водоеме с помощью окрашивания проб анилиновым голубым: методические аспекты применения / О.П. Дубовская // J. Siber. Federal Univ. Biol. – 2008. – Vol. 1. – P. 145–161.
20. Дубовская О.П. Показатели смертности, не связанной с хищниками, у кладоцерного зоопланктона в пелагиали и литорали мелководного слабоэвтрофного озера / О.П. Дубовская // Докл. АН. – 2007. – Т. 416, № 6. – С. 836–838.
21. Дубовская О.П. Сезонная динамика численности живых и мёртвых особей зоопланктона в небольшом пруду и некоторые варианты оценки смертности / О.П. Дубовская, М.И. Гладышев, В.Г. Губанов // Журн. общ. биол. – 1999. – Т. 60, № 5. – С. 543–554.
22. Дубовская О.П. Сток лимнического зоопланктона через высоконапорную плотину и его судьба в реке с быстрым течением (на примере плотины Красноярской ГЭС на р. Енисей) / О.П. Дубовская, М.И. Гладышев, О.Н. Махутова // Журн. общ. биол. – 2004. – Т. 65, № 1. – С. 81–93.
23. Загородняя Ю.А. *Oithona brevicornis* в Севастопольской бухте – случайность или новый вселенец в Черное море? / Ю.А. Загородняя // Экология моря. – 2002. – Вып. 61. – С. 43.
24. Зелезинская Л.М. «Дождь» и «антидождь» трупов гидробионтов в море / Л.М. Зелезинская // Биогические проблемы океанографии южных морей :

материалы юб. науч. сессии уч. совета Одес. отд-я. ИнБЮМ. – Киев, 1969. – С. 125–127.

25. Зелезинская Л.М. Естественная смертность некоторых форм ихтио- и зоопланктона Чёрного моря : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.17. / Зелезинская Лидия Михайловна. – Одесса, 1966. – 20 с.

26. Зелезинская Л.М. К изучению естественного отхода некоторых планктонных организмов в Чёрном море / Л.М. Зелезинская // Вопросы гидробиологии : тез. докл. I съезда Всесоюз. гидробиол. о-ва (Москва, 1–6 февр. 1965 г.). – Москва, 1965. – С. 171–172.

27. Зелезинская Л.М. К изучению естественной смертности некоторых организмов пелагиали Чёрного моря / Л.М. Зелезинская // Экологическая биогеография контактных зон моря. – Киев, 1968. – С. 135–148.

28. Зелезинская Л.М. Новые данные о массовой смертности ветвистоусого рачка *Penilia avirostris* (Dana) / Л.М. Зелезинская // Вопросы морской биологии : тез. II Всесоюз. симп. мол. ученых. - Севастополь, 1969. – С. 45–46.

29. Зелезинская Л.М. О количественных показателях смертности компонентов черноморского планктона на мелководье / Л.М. Зелезинская // Зоол. журн. – 1966. – Т. 45, № 8. – С. 1251–1253.

30. Зелезинская Л.М. О массовой гибели ветвистоусого рачка *Penilia avirostris* (Dana) в северо-западной части Чёрного моря / Л.М. Зелезинская // Гидробиол. журн. – 1966. – Т. 2, № 2. – С. 53–55.

31. Зенкевич Л.А. Моря СССР, их фауна и флора / Л. А. Зенкевич. – Москва : Учпедгиз., 1956. – 424 с.

32. Иванов В.Б. Активные красители в биологии / В.Б. Иванов. – Москва : Наука, 1982. – 224 с.

33. Изучение сезонной динамики седиментационного выноса взвешенного вещества, биогенных элементов и загрязняющих веществ из поверхностного слоя вод Черного моря в период с 1992 по 1994 гг. / С.Б. Гулин, Г.Г.

Поликарпов, В.Н. Егоров, О.В. Кривенко // Геохимия. – 1995. - Т. 4, № 6. – С. 863–873.

34. Кастальская-Карзинкина М.А. Методика определения живых и отмерших компонентов планктона на фиксированном материале / М.А. Кастальская-Карзинкина // Тр. лимнол. ст. в Косине. – 1935. – № 19. – С. 91–103.

35. Кастальская-Карзинкина. М.А. Опыт применения метода учета живых и отмерших компонентов в изучении планктона Глубокого озера / М.А. Кастальская-Карзинкина // Тр. лимнол. ст. в Косине. – 1937. – № 21. – С. 143–167.

36. Киселёв И.А. Планктон морей и континентальных вод / И.А. Киселёв. – Ленинград : Наука, 1969. – Т. 1. – 658 с.

37. Коваль Л.Г. Зоо- и некрозоопланктон Чёрного моря / Л.Г. Коваль. – Киев : Наук. думка, 1984. – 128 с.

38. Коваль Л.Г. Учёт живого и мёртвого зоопланктона как один из путей оценки жизненных условий в море / Л.Г. Коваль // II Всесоюз. конф. по биологии шельфа : тез. докл. – Киев, 1978. – С. 55–56.

39. Копытов Ю.П. Уровень загрязненности воды и донных отложений Севастопольской бухты (Черное море) / Ю.П. Копытов, Н.И. Минкина, Э.З. Самышев // Системы контроля окружающей среды : сб. науч. тр. / НАН Украины, Мор. гидрофиз. ин-т. – Севастополь, 2010. – Вып. 14. – С. 199–208.

40. Лебедева Л.П. Исследование процессов детритообразования в Чёрном море / Л.П. Лебедева, С.В. Востоков // Океанология. – 1984. – Т. 24, № 2. – С. 329–336.

41. Литвинюк Д.А. Динамика доли живых Copepoda в планктоне Севастопольской бухты и открытого побережья в 2010-2011 гг. : Выводы / Д.А. Литвинюк, Н.И. Минкина // Антропогенная трансформация морских экосистем : отчет о науч.-иссл. работе отдела функционирования морских экосистем 2008-2012. – Том 1. – Главы 1.9.4.4, 1.9.4.5. / НАН Украины, Ин-т биологии южных морей им. А.О. Ковалевского. – Севастополь, 2012. – С. 281–287. (Рук.)

42. Литвинюк Д.А. Определение доли живых организмов в культуре копеподы *Calanipeda aquae dulcis* после их окраски нейтральным красным и диацетатом флуоресцеина / Д.А. Литвинюк, Л.О. Аганесова, В.С. Муханов // Экология моря. - 2009. – Вып. 78. – С. 65–69.
43. Литвинюк Д.А. Сравнение методов определения доли живых особей в культуре копеподы *Calanipeda aquaedulcis* / Д.А. Литвинюк, Л.О. Аганесова // Понт Эвксинский VI : тез. 6-й Междунар. науч.-практ. конф. мол. ученых по проблемам водных экосистем (21-24 сент. 2009 г.). – Севастополь, 2009. – С.70 – 72.
44. Миронов О. Г. Нефтяное загрязнение и жизнь моря. – Киев : Наук. думка, 1973. – 85 с.
45. Наумова Е.Ю. Жизненные циклы и морфология представителей рода *Epischura* Forbes, 1882 (Copepoda: Calanoida) : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.18. / Наумова Елена Юрьевна ; ИБМ ДВО РАН. – Владивосток, 2006. – 22 с.
46. Одум Ю. Основы экологии / Ю. Одум ; пер. с англ. – Москва : Мир, 1975. – 740 с.
47. Определитель фауны Чёрного и Азовского морей / под. рук. Ф.Д. Мордухай-Болтовского : в 3-х т. – Киев : Наук. думка, 1969. – Т. 2. - 536 с.
48. Оценка интенсивности детритообразования в морских планктонных сообществах / Л.П. Лебедева, М.Е. Виноградов, Э.А. Шушкина, А.Ф. Сажин // Океанология. – 1982. – Т. 22, № 4. – С. 652–659.
49. Павлова Е.В. Гидрохимические и биологические исследования в бухте Омега (Чёрное море, Севастопольский шельф) / Е.В. Павлова, В.В. Мурина, Е.А. Куфтаркова // Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон и комплексное исследование ресурсов шельфа : сб. науч. тр. / НАН Украины, Мор. гидрофиз. ин-т. – Севастополь, 2001. – Вып. 2. – С. 159–176.
50. Павлова Е.В. Годовые колебания количественных показателей зоопланктона в прибрежье Севастополя (1998 - 2003) / Е.В. Павлова, Е.Б. Мельникова // Мор. экол. журн. – 2006. – Т. 5, № 2. – С. 63–73.

51. Павлова Е.В. Зоопланктон прибрежных вод юго-западного Крыма (1998 - 2006 гг.) / Е.В. Павлова, Е.Б. Мельникова // Мор. экол. журн. – 2011. – Т. 10, № 3. – С. 33–41.
52. Павлова Е.В. Изменения количественных показателей жизнеспособного зоопланктона Севастопольской бухты в 1998 – 1999 гг. (Крым. Чёрное море) / Е.В. Павлова, Е.Б. Мельникова // Гидробиол. журн. – 2005. – Т. 41, № 6. – С. 3–12.
53. Павлова Е.В. Состояние зоопланктонных сообществ в прибрежных водах Карадагского природного заповедника в 2002–2005 гг. / Е.В. Павлова, Е.В. Лисицкая // Карадаг-2009 : сб. науч. тр., посвящ. 95-летию Карадаг. науч. ст. и 30-летию Карадаг. природ. зап. Нац. акад. наук. – Севастополь, 2009. – С. 292–312.
54. Петипа Т.С. Смертность зоопланктона в Севастопольской бухте / Т.С. Петипа, Е.В. Павлова // Доп. НАНУ. – 1995. – № 6. – С. 146–148.
55. Петипа Т.С. Трофодинамика копепод в морских планктонных сообществах / Т.С. Петипа. – Киев : Наук. думка, 1981. – 243 с.
56. Подбельцева Е.В. Экологическая безопасность полигонов твердых бытовых отходов в г. Севастополе [Электронный ресурс] / Е.В. Подбельцева, А.В. Лавриненко. - Режим доступа : http://www.nbu.gov.ua/Portal/natural/Skns/2011_15/articles/11pevvg.htm
57. Раймонт Дж. Э. Планктон и продуктивность океана. Зоопланктон / Дж. Э. Раймонт. – Москва : Агрпромиздат, 1988. – Т. 2. – 544 с.
58. Распределение живого и мёртвого мезозоопланктона в прибосфорских районах Чёрного и Мраморного морей: солёностная толерантность *Acartia clausi* и *A. tonsa* / Е.С. Губарева, Л.С. Светличный, М. Ишинбилир, Г. Бельмонте // Мор. экол. журн. – 2008. – Т. 7, № 4. – С. 27–39.
59. Ряпенко Л.Н. Использование метода окрашивания проционовым красным для оценки состояния зоопланктона на северном Байкале / Л.Н. Ряпенко, В.А. Польшов // Мониторинг и оценка состояния Байкала и

- Прибайкалья : материалы 6 Всесоюз. байкальской шк.-семинара / Ин-т глобального климата и экологии. – Ленинград, 1991. – С. 144–146.
60. Сажина Л.И. Размножение, рост, продукция морских веслоногих ракообразных / Л.И. Сажина. – Киев : Наук. думка, 1987. – 156 с.
61. Самышев Э.З. Содержание взвешенного органического вещества и интенсивность его седиментации в фотическом слое вод Черного моря / Э.З. Самышев // Системы контроля окружающей среды. Средства, информационные технологии и мониторинг : сб. науч. тр. / НАН Украины, Мор. гидрофиз. ин-т. – Севастополь, 2009. – С. 352–359.
62. Связь сезонной динамики естественной смертности дафний в небольшом водохранилище с содержанием незаменимой полиненасыщенной жирной кислоты в сестоне / М.И. Гладышев, О.П. Дубовская, Н.Н. Сущик и др. // Докл. АН. – 2003. – Т. 389, № 3. – С. 417–418.
63. Семёнова А.С. Доля мертвых особей в зоопланктоне Куршского залива Балтийского моря / А.С. Семёнова // Биология внутренних вод. – 2011. – № 3. – С. 35–44.
64. Семёнова А.С. Индикаторная роль зоопланктона в оценке экологического состояния Куршского залива : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.02.08. / Семёнова Анна Сергеевна. – Борок, 2010. – 20 с.
65. Семёнова А.С. Индикаторная роль зоопланктона в оценке экологического состояния Куршского залива : дис. ... канд. биол. наук : 03.02.08 / Семёнова Анна Сергеевна. – Борок, 2010. – 253 с.
66. Семёнова А.С. Использование метода прижизненного окрашивания для оценки соотношения живых и мёртвых особей в зоопланктоне Куршского залива / А.С. Семёнова // Понт Эвксинский VI : тез. 6-й Междунар. науч.-практ. конф. мол. ученых по проблемам водных экосистем (21-24 сент. 2009 г.). – Севастополь, 2009. – С. 104–106.
67. Современное состояние и тенденции изменения экосистемы / Е.В. Павлова, Е.И. Овсяный, А.Д. Гордина [и др.] // Акватория и берега

Севастополя : экосистемные процессы и услуги обществу. – Севастополь, 1999. – С. 70–168.

68. Способ идентификации живых и мёртвых организмов мезозoopланктона в морских пробах : пат. 99008 Украина, МПК G 01 N 33/483, G 01 N 1/30. / Муханов В.С., Литвинюк Д.А. ; заявитель и патентообладатель Ин-т биологии южных морей. - № а 2010 12023 ; заяв. 11.10.10. ; опубл. 25.04.12, Бюл. № 8.

69. Способ окрашивания морского zoопланктона : а. с. 1401360 СССР : МКИ G 01 21/64, 21/91 / Б.Г. Александров, О.А. Аблов (УССР). - № 4117623/31-13 ; заявл. 15.09.86 ; опубл. 07.06.88, Бюл. № 21. – 5 с.

70. Старосила Е.В. Новые методы и направления исследований в водной микробиологии (обзор) / Е.В. Старосила // Гидробиол. журн. – 2006. – Т. 42, № 3. – С. 51–60.

71. Фрайштат Д.М. Реактивы и препараты для микроскопии : справочник / Д.М. Фрайштат. – Москва : Химия, 1980. – 480 с.

72. Фрайштат Д.М. Реактивы и препараты. Хранение и перевозка / Д.М. Фрайштат. – Москва : Химия, 1977. – 424 с.

73. Черепанов О.А. Модификация формул расчёта коэффициентов смертности zoопланктона при его дифференциации на живых и мёртвых по постмортальным признакам / О.А. Черепанов, Е.В. Павлова // Системы контроля окружающей среды. Средства и мониторинг : сб. науч. тр. / НАН Украины, Мор. гидрофиз. ин-т. – Севастополь, 2008. – С. 411–413.

74. Черепанов О.А. Оценка коэффициентов смертности zoопланктона по данным ловов с использованием дифференциацию на живую и мёртвую фракции / О.А. Черепанов, Е.В. Павлова // Системы контроля окружающей среды. Средства и мониторинг : сб. науч. тр. / НАН Украины, Мор. гидрофиз. ин-т. – Севастополь, 2008. – С. 406–410.

75. Activity and diversity of bacterial cells with high and low nucleic acid content / P. Servais, E.O. Casamayor, C. Courties, P. Catala // Aquat. Microb. Ecol. – 2003. – Vol. 33. – P. 41–51.

76. Annual dynamics of abundance, biomass and survival of meroplankton in Sevastopol bay, Black sea / E.V. Pavlova, V.V. Murina, R.B. Kemp, J.G. Wilson [et.al.] // Mar. Ecol. J. – 2007. – Vol. 6, no. 2. – P. 63–78.
77. Bickel S.L. Boat-generated turbulence as a potential source of mortality among copepods / S.L. Bickel, J.D. M. Hammon, K.W. Tang // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. – 2011. – Vol. 401, iss. 1-2. – P. 105–109.
78. Bickel S.L. Use of aniline blue to distinguish live and dead crustacean zooplankton composition in freshwaters / S.L. Bickel, K.W. Tang, H.P. Grossart // Freshwater Biol. – 2009. – Vol. 54, iss. 5. – P. 971–981.
79. Comparison between morphological and staining characteristics of live and dead eggs of *Schistosoma mansoni* / A. Sarvel, J. Kusel, N. Araujo [et.al.] // Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. – 2006. – Vol. 101. – P. 289 – 292.
80. Copepod carcasses in the ocean. I. Over seamounts / L. Haury, C. Fey, G. Gal [et.al.] // Mar. Ecol. Prog. Ser. – 1995. – Vol. 123. – P. 57–63.
81. Crippen R.W. The use of neutral red and evans blue for live-dead determinations of marine plankton / R.W. Crippen, J.L. Perrier // Stain. Technol. – 1974. – Vol. 49, no. 2. – P. 97–104.
82. Culverhouse P. F. Automatic image analysis of plankton: future perspectives / P. F. Culverhouse, R. Williams, M. Benfield // Mar. Ecol. Progr. Ser. – 2006. – Vol. 312. – P. 297–309.
83. Dressel D.M. Vital starting to sort dead and live copepods / D.M. Dressel, D.R. Heinle, M.C. Grote // Chesapeake Sci. – 1972. – Vol. 13. – P. 156–159.
84. Dubovskaya O.P. Evaluation of possible causes of non-predatory mortality of crustacean zooplankton in a small Siberian reservoir / O.P. Dubovskaya // J. Siberian Federal Univ. Biol. – 2008. - No. 1. – P. 145–161.
85. Elliott D.T. Influence of carcass abundance on estimates of mortality and assessment of population dynamics in *Acartia tonsa* / D.T. Elliott, K.W. Tang // Mar. Ecol. Prog. Ser. – 2011. – Vol. 427. – P. 1–12.

86. Elliott D.T. Simple staining method for differentiating live and dead marine zooplankton in field samples / D.T. Elliott, K.W. Tang // *Limnol. Oceanogr.: Methods*. – 2009. – Vol. 7. – P. 585–594.
87. Elliott D.T. Spatial and temporal distributions of live and dead Copepods in the lower Chesapeake Bay (Virginia, USA) / D.T. Elliott, K.W. Tang // *Estuaries Coasts*. – 2011. – Vol. 34, iss. 5. – P. 1039–1048.
88. Evaluation of non-predatory mortality of two *Daphnia* species in a Siberian reservoir / M. I. Gladyshev, O. P. Dubovskaya, V. G. Gubanov, O. N. Makhutova // *J. Plankt. Res.* – 2003. – Vol. 25, iss. 8. – P. 999–1003.
89. Farran G.P. Biscayan plankton collected during a cruise of H.M.S. Research, 1900. Pt. 14: The Copepoda / G.P. Farran // *J. Linn. Soc. (Zool.)*. – 1926. – Vol. 36. – P. 219–310.
90. Fleming J.M. Preservation of vitally stained zooplankton for live/dead sorting / J.M. Fleming, J. Coughlan // *Estuaries*. – 1978. – Vol. 1. – P. 135–137.
91. Francisco D.E. Acridine orange — epifluorescence technique for counting bacterial in natural waters / D.E. Francisco, R.A. Mah, A.C. Rabin // *T. Am. Microsc. Soc.* – 1973. – Vol. 92, no. 3. – P. 416–421.
92. Genin A. Copepod carcasses in the ocean. II. Near coral reefs / A. Genin, G. Gal, L. Haur // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* – 1995. – Vol. 123. – P. 65–71.
93. Gries T. Estimates of the non-consumptive mortality of mesozooplankton by measurement of sedimentation losses / T. Gries, H. Güde // *Limnol. Oceanogr.* – 1999. – Vol. 44, no. 2. – P. 459–465.
94. Gubanov A.D. Establishment of *Oithona brevicornis* Giesbrecht, 1892 (Copepoda: Cyclopoida) in the Black Sea / A.D. Gubanov, D.A. Altukhov // *Aquat. Invasions*. – 2007. – Vol. 2, no. 4. – P. 407–410.
95. Harding G.C.H. Decomposition of marine copepods / G.C.H. Harding // *Limnol. Oceanogr.* – 1973. – Vol. 18, no. 4. – P. 670–673.
96. Hirst A.G. Mortality of marine planktonic copepods: global rates and patterns / A.G. Hirst, T. Kiørboe // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* – 2002. – Vol. 230. – P. 195–209.

97. Horvath T.G. Mortality of zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, veligers during downstream transport / T.G. Horvath, G.A. Lamberti // Freshwater Biol. – 1999. – Vol. 42, no 1. – P. 69–76.
98. Kimmerer W.J. High mortality in a copepod population caused by a parasitic dinoflagellate / W.J. Kimmerer, A.D. McKinnon // Mar. Biol. – 1990. – Vol. 107, iss. 3. – P. 449–452.
99. Kirillin G. Modeling sinking rate of zooplankton carcasses: Effects of stratification and mixing / G. Kirillin, H. Grossart, K.W. Tang // Limnol. Oceanogr. – 2012. – Vol. 57, no. 3. – P. 881–894.
100. Lebaron P. Does the high nucleic acid content of individual bacterial cells allow us to discriminate between active cells and inactive cells in aquatic systems? / P. Lebaron, P. Servais, H. Agogue // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – Vol. 67, no. 4. – P. 1775–1782.
101. Microbial activities accompanying decomposition of cladoceran and copepod carcasses under different environmental conditions / K.W. Tang, S.L. Bickel, C. Dziallas, H.P. Grossart // Aquat. Microb. Ecol. – 2009. – Vol. 57. – P. 89–100.
102. Molecula and microscopic evidence of viruses in marine copepods / D.S. Dunlap, T. F. F. Ng, K. Rosario, J.G. Barbosa // PNAS. – 2013. – Vol. 110, no. 4. – P. 1375–1380.
103. Nemes Z. The pharmacological relevance of vital staining with neutral red / Z. Nemes, R. Dietz, J. B. Lüth // Cell. Mol. Life Sci. – 1979. – Vol. 35, no.11. – P. 1475–1476.
104. Ohman M.D. The inevitability of mortality / M.D. Ohman, S.N. Wood // ICES J. Mar. Sci. – 1995. – Vol. 52. – P. 517–522.
105. Onji M. An evaluation of viable dyes suitable for marine phytoplankton / M. Onji, T. Sawabe, Y. Ezura // Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ. – 2000. – Vol. 51, no. 3. – P. 153–157.

106. Pavlova E.V. Anthropogenic impact on the planktonic communities / E.V. Pavlova, E.A. Kuftarkova // MED-COAST 95 (Oct. 24–27, Tarragona, Spain) / Ed. E. Ozhan. – Tarragona, 1995. – P. 57–74.
107. Polishchuk L.V. Comparison of two approaches used to calculate zooplankton mortality / L.V. Polishchuk, A.M. Ghilarov // Limnol. Oceanogr. – 1981. – Vol. 26. – P. 1162–1168.
108. Porter K.C. The use of DAPI for identifying and counting of aquatic microflora / K.C. Porter, Y.S. Feig // Limnol. Oceanogr. – 1980. – Vol. 25, no. 5. – P. 943 – 948.
109. Rapid assessment of copepod (*Calanus helgolandicus*) embryo viability using fluorescent probes / I. Buttino, Santo M. do Espirito, A. Ianora, A. Miralto // Mar. Biol. – 2004. – Vol. 145. – P. 393–399.
110. Repetto G. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity / G. Repetto, A. Peso, J.L. Zurita // Nat. Protocols. – 2008. – Vol. 3, no. 7. – P. 1125–1131.
111. Seasonal dynamic of phototrophic epibionts on crustacean zooplankton in a eutrophic reservoir with cyanobacterial bloom / O.P. Dubovskaya, E.P. Klimova, V.I. Kolmakov [et.al.] // Aquat. Ecol. – 2005. – Vol. 39. – P. 167–180.
112. Seepersad B. Use of aniline blue for distinguishing between live and dead freshwater zooplankton / B. Seepersad, R.W. Crippen // J. Fish. Res. Board Canada. – 1978. – Vol. 35. – P. 1363–1366.
113. Semenova A.S. Proportion of dead individuals in the zooplankton of the Curonian Lagoon of the Baltic Sea / A.S. Semenova // Inland Water Biol. – 2011. – Vol. 4, no. 3. – P. 332–340.
114. Sieracki C.K. An imaging-in-flow system for automated analysis of marine microplankton / C.K. Sieracki, M.E. Sieracki, C.S. Yentsch // Mar. Ecol. Prog. Ser. – 1998. – Vol. 168. – P. 285–296.
115. Study of non-consumptive mortality of Crustacean zooplankton in a Siberian reservoir using staining for live/dead sorting and sediment traps / O.P.

Dubovskaya, M.I. Gladyshev, V.G. Gubanov, O.N. Makhutova // *Hydrobiologia*. – 2003. – Vol. 504. – C. 223–227.

116. Tang K.W. Linkage between crustacean zooplankton and aquatic bacteria / K.W. Tang, V. Turk, H.-P. Grossart // *Aquat. Microb. Ecol.* – 2010. – Vol. 61. – P. 261–277.

117. Tang K.W. Microbial abundance, composition and enzymatic activity during decomposition of copepod carcasses / K.W. Tang, K.M.L. Hutalle, H.P. Grossart // *Aquat. Microb. Ecol.* – 2006. – Vol. 45. – P. 219–227.

118. Tang K.W. Occurrence of copepod carcasses in the lower Chesapeake Bay and their decomposition by ambient microbes / K.W. Tang, C.S. Freund, Ch.L. Schweitzer // *Estuar. Coast. Shelf Sci.* – 2006. – Vol. 68. – P. 499–508.

119. Temnykh A. New record of the planktonic copepod *Oithona davisae* Ferrari and Orsi in the Black Sea with notes on the identity of “*Oithona brevicornis*” / A. Temnykh, S. Nishida // *Aquat. Invasions*. – 2012. – Vol. 7, no. 3. – P. 425–431.

120. Terazaki M. Occurrence of large numbers of carcasses of the large, grazing copepod *Calanus cristatus* from the Japan Sea / M. Terazaki, M. Wada // *Mar. Biol.* – 1988. – Vol. 97. – P. 177–183.

121. The seawater pollution survey in the northern Black Sea / V.S. Dzitsky, N.I. Minkina, I.G. Orlova, E.Z. Samyshev // *Turkish J. Fish. Aquat. Sci.* – 2012. – Vol. 12. – P. 507–522.

122. Tomasovic S.P. Neutral Red uptake and clonogenic survival assays of the hyperthermic sensitization of tumor cells to tumor necrosis factor / S.P. Tomasovic, M. Barta, J. Klostergaard // *Radiat. Res.* – 1989. – Vol. 119, no. 2. – P. 325–337.

123. Use of FDA and flow cytometry to assess metabolic activity as an indicator of nutrient status in phytoplankton / J.D. Brookes, S.M. Geary, G.G. Ganf, M.D. Burch // *Mar. Fresh. Res.* – 2000. – Vol. 51. – P. 817–823.

124. Weikert H. Copepod carcasses in the upwelling region south of Cap Blanc, N.W. Africa / H. Weikert // *Mar. Biol.* – 1977. – Vol. 42. – P. 351–355.

125. Weikert H. Distribution and occurrence of pontellids (Copepoda, Calanoida) in the Central and South Atlantic Ocean / H. Weikert // Ber. dt. wiss. Kommn Meeresforsch. – 1975. – Vol. 24. – P. 134–150.
126. Wetzel R.G. Death, detritus, and energy flow in aquatic ecosystems / R.G. Wetzel // Freshwater Biol. – 1995. – Vol. 33. – P. 83–89.
127. Wheeler E. H. Copepod detritus in the deep sea / E.H. Wheeler // Limnol. Oceanogr. – 1967. – Vol. 12. – P. 697–702.
128. Yamamoto A. Vital staining of autophagic vacuoles in differentiating cells of *Dictyostelium discoideum* / A. Yamamoto, I. Takeuchi // Differentiation. – 1983. – Vol. 24, no. 1–3. – P. 83–87.
129. Zajączkowski M. Estimation of zooplankton mortality caused by an Arctic glacier outflow / M. Zajączkowski, J. Legeżyńska // Oceanologia. – 2001. – Vol. 43, no. 3. – P. 341–351.
130. Zooplankton carcasses and non-predatory mortality in freshwater and inland sea environments / K.W. Tang, M.I. Gladyshev, O.P. Dubovskaya, G. Kirillin, H.-P. Grossart // J. Plankt. Res. – 2014. – Vol. 36, no. 3. – P. 597–612.
131. Zooplankton community state in the Northeastern Marmara Sea during early autumn with comments on mass mortality of the Black Sea species due to the salinity gradient / L. S. Svetlichny, E. Hubareva, A. Kideys [et al.] // J. Black Sea/Mediterranean Environment. – 2006. – Vol. 12. – P. 213–231.