

ПРОБ 2010

ПРОБ 98

- 109 -

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ им. М. В. ЛОМОНОСОВА  
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

## ПРОБЛЕМЫ СОВРЕМЕННОЙ БИОЛОГИИ

УДК 574.5.08

№ 641-Б 90 05.02.90

Сабурова М.А., Поликарпов И.Г.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НЕКОТОРЫХ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО  
УЧЕТА БЕНТОСНЫХ ДИАТОМОВЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙВведение.

При исследовании сообщества часто возникает проблема выбора наиболее информативных и доступных для измерения параметров. Чаще других используется численность или плотность популяции. Это связано с тем, что для определения численности тех или иных объектов, как правило, существует ряд более или менее отработанных методик. В этой связи большое значение приобретает выбор конкретной методики количественного учета, адекватно отражающей численность исследуемой популяции. Поскольку тотальный подсчет всех ее элементов, как правило, невозможен, существенным моментом является определение размеров репрезентативной выборки, позволяющей получить статистически достоверные результаты.

В данной работе нами была предпринята попытка сопоставления различных методик количественного учета бентосных диатомовых водорослей с точки зрения статистической достоверности получаемых результатов.

Обычно численность диатомовых определяют методом прямого счета в камерах небольшого объема /камера Горяева -  $0,9 \text{ мм}^3$ , камера Нахотта -  $0,05 \text{ см}^3$  и т.п./ или на постоянных препаратах. Это определяется мелкими размерами водорослей и связано с необходимостью применения больших увеличений при подсчете, т.к. природные фитоценозы состоят из довольно большого количества видов, и достоверное определение до вида возможно только при увеличении в 400-1500 раз.

Другим важным аспектом проблемы адекватного отражения численности популяции является учет неоднородности физиологического состояния организмов. Так, Роухияйнен и Сеничкина /4/ показали, что сообщество фитопланктона не всегда состоит из физио-

Институт биологии

Южных морей АН УССР

БИБЛИОТЕКА

№ 265

логически полноценных клеток. По данным этих авторов, в отдельных пробах доля отмирающих клеток и пустых створок диатомовых водорослей составляла до 70 % от общей численности этих водорослей. Особенно актуальна эта проблема при исследовании бентосных диатомовых водорослей, т.к. в пробах присутствует большое количество хорошо сохраняющихся длительное время кремниевых створок этих водорослей, учет которых может существенно исказить реальную картину состава сообщества.

#### Материал и методы исследования.

Материалом для исследования послужили пробы, собранные на среднем горизонте песчаной литорали /Кандалакшский залив, Белое море/ в мае-сентябре 1987-88 гг. Детальная характеристика этого участка дана в работе /3/. Сообщество диатомовых водорослей на данном участке представлено более чем 40 видами, сильно различающимися размерами и частотой встречаемости в пробах.

Отбор проб производился стеклянной трубкой с внутренним диаметром 1 см на глубину 3 см. Каждая проба включала в себя несколько /от 3 до 10/ подпроб объемом 3 см<sup>3</sup>.

Материал фиксировался 4 % раствором формалина и /в 1988 г./ - 40° этанолом, содержащим 5 % /вес/объем/ спирторастворимого эозина /"Хемапол", ЧССР/, для одновременного окрашивания.

Отделение диатомовых водорослей от осадка производилось методом отмучивания их от минеральной фракции и крупных частиц детрита и последующим осаждением взвеси клеток центрифугированием /3 мин при 3000 об·с<sup>-1</sup>/. Центрифугирование в таком режиме обеспечивало полное осаждение водорослей. Крупные диатомовые выделялись из песка методом Улига /8/ с промыванием фильтрованной морской водой вместо использования льда.

Для изготовления постоянных препаратов отделенные от осадка водоросли выдерживались в растворе серной кислоты с добавлением бихромата калия в течение суток. Далее материал отмывался многократным центрифугированием до получения белого осадка, содержащего створки диатомовых. Створки заключали в анилино-формальдегидную смолу, обладающую высоким коэффициентом преломления /до 1,8/.

Подсчет клеток производился в камере Горяева при увеличении 400<sup>x</sup> /камера просчитывалась тотально/, на постоянных препаратах при увеличении 1350<sup>x</sup> с использованием масляной иммерсии

и прижизненно в чашках Петри в полях зрения при увеличении  $32\times$ .

### Результаты и обсуждение.

Первым этапом работы был анализ данных, полученных при просчете разного количества камер Горяева /от 3 до 10/, которые сравнивались с результатами счета на постоянных препаратах при разном количестве полей зрения для одной пробы. Вычислялись среднее  $\bar{x}$ , дисперсия  $s$ , коэффициент вариации  $cv$ , относительная ошибка  $r$  и количество повторностей, необходимых для достижения 20 % ошибки  $n$  /табл.1/ согласно работе /5/. Учитывалось 30 видов диатомовых водорослей. Результаты приведены для некоторых видов, которые являются характерными представителями трех больших групп, выделенных на основе данных по численности и линейным размерам: 1 - мелкие массовые виды; 2 - мелкие редкие виды; 3 - крупные редкие виды.

Таблица 1. Статистические параметры счета клеток в камере Горяева.

| группа | n=3       |     |     |      |      | n=10      |     |     |      |      |
|--------|-----------|-----|-----|------|------|-----------|-----|-----|------|------|
|        | $\bar{x}$ | s   | cv  | r, % | n    | $\bar{x}$ | s   | cv  | r, % | n    |
| 1      | 49        | 7,2 | 15  | 17   | 9    | 48        | 4,6 | 10  | 6    | 4    |
|        | 15        | 1,7 | 12  | 14   | 6    | 14        | 2,3 | 16  | 10   | 10   |
| 2      | 2         | 1,0 | 50  | 57   | 125  | 2         | 1,0 | 47  | 29   | 86   |
|        | 1,3       | 1,5 | 115 | 130  | 649  | 1,5       | 1,1 | 72  | 45   | 199  |
| 3      | 0,3       | 0,6 | 173 | 196  | 1149 | 0,4       | 0,7 | 175 | 108  | 1173 |
|        | 3         | 1,7 | 58  | 66   | 129  | 2         | 1,2 | 58  | 36   | 128  |

Из таблицы видно, что для видов первой группы получение статистически достоверных результатов при определении численности возможно при просчете трех камер Горяева, и увеличение числа повторностей до 10 практически не меняет величину относительной ошибки. Для редких видов величина ошибки при данной методике счета очень велика и при увеличении числа повторностей в 3 раза значительно не уменьшается. Так, для получения статистически достоверных результатов количественного учета некоторых видов /2 и 3 группы/ необходимо увеличить число повторностей до 1149-1173 для достижения хотя бы 20 % ошибки, что практически нереально. В ряде случаев /в зависимости от поставленной задачи/ наибольший интерес представляют виды, входящие в 1 и 3 группы, т.к. их роль в функционировании сообщества на-

более значительна: у первых — за счет высокой численности, у вторых — за счет большой биомассы клеток. Доля видов второй группы в общей биомассе сообщества невелика, и они могут представлять интерес, например, при исследованиях систематического характера.

Количественный учет водорослей на постоянных препаратах сопряжен с рядом методических трудностей, главной из которых является необходимость использования больших увеличений при микроскопировании, что значительно снижает точность счета, особенно для редких видов. Однако, количество видов, достоверно различаемых на постоянных препаратах, выше, нежели в камере Горяева. В данной работе при использовании постоянных препаратов была установлена систематическая принадлежность для 47 видов водорослей, тогда как в камере Горяева различали только 30 видов.

Следующим этапом работы был выбор методики получения статистически достоверной оценки численности для видов третьей группы. Для редких крупных видов увеличение точности счета можно достигнуть двумя способами: либо сгустить пробу, либо увеличить объем просматриваемой выборки. Сгущение проб для бентосных организмов — способ неприемлемый, т.к. пробы содержат большое количество детрита, что маскирует клетки водорослей и затрудняет счет. Беляевой /1/ был предложен способ учета крупных форм планктонных диатомовых в камере Богорова, что значительно увеличивает объем просматриваемой выборки по сравнению с камерой Горяева, но к бентосным водорослям он мало применим из-за указанных выше особенностей биотопа.

По нашим наблюдениям, крупные диатомовые хорошо выделяются методом Улига, причем при соответствующем подборе сита можно избежать выделения фракции крупного детрита. Такой метод позволяет учитывать до 11 видов крупных диатомей с линейными размерами от 60 мкм и более. Для проверки полноты выделения водорослей проба песка, из которой велось вымывание, после окончания промывки просматривалась. На основании таких контрольных просмотров данный метод был признан нами удовлетворительным, т.к. при его использовании выделялось 90-95 % клеток водорослей. Поскольку этот метод позволяет количественно выделять практически всех представителей микро- и мейобентоса, он незаменим в тех случаях, когда необходим совместный учет в одной пробе нескольких компонентов сообщества.

Третьим этапом исследований являлся поиск оптимальной ме-

тодики фиксации и окрашивания, позволяющей оценить физиологическое состояние водорослей. Чаще всего данная задача решается при помощи люминесцентной микроскопии /4/. Ряд авторов для этой цели применяли основной фуксин, нейтральный красный, эозин, эритрозин /2,6,7/. В данной работе для окраски клеток применялся эозин. Использование этого красителя позволило отличать живые клетки диатомовых /ярко-розовая окраска цитоплазмы/ от мертвых при работе на обычном световом микроскопе. При использовании этого метода для оценки численности водорослей в пробах, взятых на разных стадиях развития сообщества, нами было показано, что доля мертвых клеток и створок составляла от 20 до 80 % от общей численности клеток в пробе.

Т.о., для объективной оценки видового и количественного состава бентосных диатомовых водорослей необходимо сочетание различных методов выделения, фиксации и учета в зависимости от таких индивидуальных для каждого вида показателей, как линейные размеры и частота встречаемости. Общепринятая методика счета в камерах малого объема дает статистически достоверные результаты только для небольшого количества массовых видов. Предложенная методика количественного учета для крупных видов дает хорошие результаты и позволяет оценивать численность крупных редких видов с приемлемой ошибкой. Изучение постоянных препаратов, по нашему мнению, не может использоваться для количественной оценки численности. По-видимому, этот метод может использоваться в качестве дополнительного для разного рода специальных задач, в частности, систематических. В бентосных сообществах, где в осадках сохраняется большое количество створок ранее отмерших диатомей, не применимы методы оценки численности, основанные на подсчете створок, и для адекватной оценки требуется, как минимум, контроль за количеством живых клеток, достигаемый при помощи окраски клеток.

Литература. 1.Беляева Т.В.-Океанология.-1977.-17.-№ 4.-С.744-749. 2.Брагинский Л.П. и др.-Пресноводный планктон в токсической среде.-Киев:Наукова Думка,1987.-С.25. 3.Бурковский И.В.-Зоол.ж.-1978.-57.-№ 3.-С.325-336. 4.Роухияйнен М.И.,Сеничкина Л.Г.-Гидробиол.ж.-1985.-21.-№ 1.-С 12-16. 5.Урбах В.Ю. Биометрические методы.-М.:Наука,1964.-415 с. 6.Miller A.R. at al.-J. of Ecology.-1987.-75.-P.693-709. 7.Owen B.B. at al.-ASTM, Spec. Tech.Publ.-1979.-60.-P.70-76. 8.Uhlir G.H.-Helgol.Wiss.Meeresunters.-1973.-25.-P.173-195.

Институт биологии

Южных морей УССР

Е.С.МОТЕНА

№265 деп.