

ПРОВ 2010

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

ПРОВ 98

БИОЛОГИЯ МОРЯ

Вып. 18

БИОЛОГИЯ ОБРАСТАНИЙ



ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКОВА ДУМКА»
КИЕВ — 1970

ОБ УСОВЕРШЕНСТВОВАНИИ МЕТОДА ПЛАСТИНОК ОБРАСТАНИЯ ДЛЯ НАБЛЮДЕНИЙ ЗА ПЕРИФИТОННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Ю. А. Горбенко

Изучение развития микроорганизмов перифитона на предметах, погруженных в морскую воду, представляет интерес не только в отношении их познания в природе. Эти организмы привлекают также внимание как образователи первичной слизистой пленки, с которой начинается обрастание погруженных предметов.

Одним из наиболее удобных и распространенных методов для изучения перифитонных микроорганизмов является метод пластинок обрастания. Этот метод был введен в гидробиологию Гентшелем (Gentschel, 1917) и затем для изучения микроперифитона применен С. Н. Дулаковым (1925), Генрици (Henrici, 1933), Г. С. Корзинкиным (1934) и др.

К сожалению, метод пластинок обрастания имеет существенный недостаток, поскольку изучение прикрепившихся на поверхность пластинок микроорганизмов при этом ведется только после фиксации и окраски, прерывая процесс развития микрообрастания на каком-нибудь его этапе. Кроме того, при высушивании и окраске частично искажается картина обрастания и создается не совсем точное представление о ряде организмов перифитона, изменяющихся при обработке их перед микроскопированием. Вероятно, поэтому еще нет ясного представления у многих исследователей об очередности оседания основных организмов микрообрастания, не выяснены многие закономерности в развитии перифитонных микроорганизмов. Также нет еще единого мнения в литературе о роли морских бактерий в обрастании погруженных предметов.

Б.В.Перфильевым и Д.Р.Габе (1961) предложен оригинальный капиллярный метод для изучения микроорганизмов ила, грунтов и почвенных вод, которые представляют собой, по сути дела, капиллярные системы, поэтому микроорганизмы развиваются в капиллярах почти так же, как в естественных условиях. Однако твердые, большей частью относительно гладкие поверхности предметов, погруженных в воду человеком, подверженные обрастанию, например поверхность подводной части судов и кораблей, стенок трубопроводов и навигационных сооружений, очень далеки от капиллярных систем.

В связи с этим представляет интерес перифитометр, рекомендованный Перфильевым и Габе (1961) для изучения ранних стадий водных микрообрастаний, принцип работы которого заключается в том, что изучаемая поверхность погружается в воду и извлекается из нее в закрытом состоянии, а затем может микроскопироваться при больших увеличениях. Прибор имеет ряд существенных недостатков, делающих невозможным его широкое применение: 1) значительная сложность изготовления стекляннo-капиллярной части прибора; 2) большая хрупкость и тонкость стеклянной части прибора, что особенно нежелательно в условиях частого и сильного волнения моря; 3) ненадежность сложной и дорогой системы зубчатых передач для открывания кассет, которая может отказаться даже при слабой коррозии, обрастании или незначительном изгибе наружной либо внутренней трубок, заключающих систему; 4) прибор дает возможность изучать только разовую картину первичного обрастания, так как образующаяся слизистая пленка уже через сутки-двое не даст соскользнуть под действием собственного веса точно подогнанным защитным футлярам по ловчей ленте перифитометра; 5) первичное обрастание необходимо изучать не только на стеклянных, но и на любых других, в том числе непрозрачных предметах. Некоторые из перечисленных недостатков, по-видимому, могут препятствовать широкому распространению перифитометра и в пресноводных водоемах.

Для изучения процесса микрообрастания необходим метод, наиболее приближающий эксперимент к естественным условиям. Таковым можно считать метод пластинок обрастания, однако усовершенствованный таким образом, чтобы была возможность изучать непрерывно продолжающийся процесс развития перифитонных микроорганизмов от носительно долгое время.

Таковыми качествами обладает использованная нами в роли "камеры обрастания" камера Горяева, которая служит обычно для учета форменных элементов крови. Особенностью конструкции последней являются средняя часть, опущенная на 0,1 мм по сравнению с боковыми частями, и две микросеточки, нанесенные на ней. Это позволяет через любые промежутки времени извлекать камеру из моря и, наложив чистое обезжиренное покровное стекло, сохранять тонкий слой морской воды над наблюдаемой поверхностью и в нарезанных там же канавках, не прерывая нормального течения процесса развития перифитонных микроорганизмов на наблюдаемой поверхности. При длительных наблюдениях, более часа, вода под покровным стеклом легко заменяется с помощью пипетки свежей морской водой, которая наносится каплями с одной стороны камеры, а с другой — при легком наклоне сливается. Таким образом можно длительно наблюдать цикл развития любых перифитонных микроорганизмов при разных увеличениях светового микроскопа, с иммерсией и без нее.

Микросетки камеры в сочетании с препаратоводителем СТ-12, установленном на столике микроскопа, позволяют всегда легко находить точно одни и те же точки поверхности. После окончания наблюдений покровное стекло снимается и камера снова немедленно погружается в морскую воду.

Перед использованием чистые камеры в закрытой чашке Петри транспортировались к месту постановки опыта в море и обратно в лабораторию. До постановки камер в море каждая из них всегда просматривалась под микроскопом. В море камеры устанавливаются по методу А.Г.Родиной (1956) в прорезях резинового шланга, привязанного к капроновому шнуру.

Остановимся на возможных погрешностях, которые могут возникнуть при наблюдениях, осуществляемых с помощью камер обрастания.

1. Некоторые исследователи считают, что при погружении в воду и при извлечении на поверхность пластинок обрастания к ним могут прикрепляться микроорганизмы из пленки нейстона и картина первичного обрастания будет искажена. Ю.И.Сорокин (1963) отмечает по этому поводу, что очищенное и обожженное стекло, поверхность которого тем самым активирована в отношении адсорбции, проходит в открытом виде поверхностную пленку, обогащенную микрофлорой и отбросами с судна, и загрязняется сразу же после прохождения его через эту пленку.

Чтобы проверить, насколько сказанное справедливо и для камер обрастания, погружавшихся в море, мы провели специальную работу и исследования. В 30 - 50 квадратах микросетки камеры Горяева учитывались все имеющиеся там бактериальные клетки, которые всегда остаются на поверхности любых пластинок обрастания, как бы хорошо они не очищались. После этого камеры погружались в море или проточный аквариум и снова извлекались оттуда. Такие операции производились много раз и в периоды спокойного моря и во время его волнения. Перед погружением камер поверхностная пленка воды либо хорошо разгребалась, либо камеры погружались осторожно, чтобы по возможности меньше разрушать пленку нейстона. Затем тщательно учитывались все бактериальные клетки в определенных квадратах микросетки камеры.

Результаты этой работы показали следующее; а) когда море спокойно или поверхностная пленка не разгребалась, в изучаемых квадратах сеточки на поверхности камеры можно было насчитать примерно 5-15 бактериальных клеток (следует отметить, что обычно в 30 тех же квадратах уже после первых суток экспозиции камер в морской воде мы насчитывали 100-200 клеток бактерий); б) в случае если море неспокойно или если при спокойном море поверхностная пленка хорошо разгребалась каким-нибудь предметом перед погружением камер, на изучаемом участке поверхности или совсем не наблюдалось вновь появившихся клеток бактерий, или обнаруживалось всего 1-5 штук.

В тех случаях, когда камера обрастания осторожно опускалась и вынималась из воды большого проточного аквариума или моря в спокойном состоянии, иногда нам удавалось наблюдать нейстонных бактерий. Они захватывались с той частью воды, которая остается на средней части камеры при извлечении ее из морской воды. При этом бактерии нейстона располагались в поверхностной пленке и наблюдались под покровным стеклом при небольшом подъеме объектива микровинтом. В основном это палочковидные формы и похожи на сплавляемый по водоему лес, если на него смотреть сверху. Через 15-30 мин нейстонные бактерии адсорбировались к поверхности покровного стекла (не на камеру обрастания!).

Таким образом, загрязнение камер обрастания из поверхностной пленки даже и в том случае, если она не разгребалась и море было спокойно, незначительно. Если море неспокойно или поверхностная

пленка разгребалась перед самым погружением и выемкой камер, опасность такого загрязнения практически отсутствует.

При пользовании обычными пластинками обрастания, которые после экспозиции в море будут высушиваться, затем фиксироваться и т.п., очевидно необходимо не только разгребать поверхностную пленку воды перед постановкой и снятием пластинок, но после извлечения из морской воды пластинки должны быть тщательно сполоснуты стерильной морской водой, для того чтобы смыть капли воды с поверхностной пленкой нейстона.

При высыхании такой пластинки бактерии нейстона окажутся на наблюдаемой поверхности и могут искажать результаты учета перифитонных микроорганизмов. В таком случае утверждение Ю.И.Сорокина о возможности загрязнения пластинок обрастания из поверхностной пленки воды вполне справедливо.

2. По мнению некоторых исследователей, отдельные перифитонные микроорганизмы могут смываться движением окружающей воды при извлечении из нее пластинок обрастания. Это положение было также проверено на камерах обрастания после различных сроков экспозиции их в воде. Предварительно замечались определенные участки поверхности камеры со всеми микроорганизмами, находящимися там. Затем изучаемая поверхность помещалась под сильную струю воды из водопроводного крана, после чего под микроскопом констатировались изменения, происшедшие на поверхности камеры.

Результаты показали, что прикрепленные перифитонные микроорганизмы — бактерии, Protozoa и диатомовые водоросли, то есть те, которые составляют в основном первичные обрастания, сильной струей воды в течение нескольких минут почти совсем не смывались. Вода смывала только те из организмов перифитона, которые наблюдались обычно в движении, — это в основном ресничные инфузории и жгутиконосцы.

Таким образом, перифитонные микроорганизмы, по-видимому, при перемещениях пластинок и камер обрастания в толще воды не смываются. Если осуществлять подъем пластинок обрастания медленно, то на изучаемой поверхности, вероятно, могут сохраниться даже неприкрепленные микроорганизмы. С помощью камер обрастания удастся наблюдать в динамике жизнь некоторых перифитонных микроорганизмов.

1. Отмечено, что первыми на погруженной поверхности появляются бактерии (палочки, вибрионы и кокковидные формы; количество их

быстро увеличивается и уже после первых суток составляет 1000-3000 клеток на 1 см². Почти одновременно с бактериями на погруженной поверхности появляются прикрепленные простейшие микроорганизмы и бентосные формы диатомовых водорослей. Развитие всех этих микроорганизмов продолжается, сменяются формы простейших, диатомовых. Среди бактерий происходят также изменения: после 5-10-х суток численность коккоидных форм начинает преобладать над числом палочковидных, появляются нитевидные бактерии, спирохеты, актиномицеты, а диатомовые, размножаясь, занимают всю поверхность стекла. В результате всего этого на погруженной поверхности образуется так называемая первичная, или слизистая, пленка.

2. С помощью камеры обрастания удалось наблюдать стадию бесполого размножения у одного из прикрепленных простейших микроорганизмов *Polysacca dumosa* (D u n k e r l y) — формирование и отделение "бродяжки", продолжающееся двое суток. Используя камеру обрастания, Л.А.Телкова (1964) обнаружила, что хоботковые жгутиконосцы рода *Rhynchomonas* питаются перифитонными бактериями, втягивая их через хоботок. При этом один организм в течение 10 мин может втянуть через хоботок до восьми бактериальных клеток.

3. Наблюдения в течение нескольких суток подряд за развитием одних и тех же микроколоний бактерий дали возможность подсчитать количество бактериальных клеток в колониях. Оказалось, что с первых на вторые сутки число клеток удвоилось, а со вторых на третьи — утроилось. Таким образом, очевидно, с помощью камер обрастания можно вычислять также темп размножения перифитонных бактерий.

В В В О Д Ч

Результаты проделанной работы показали, что наблюдения за развитием перифитонных микроорганизмов можно успешно проводить с помощью камеры обрастания, в качестве которой применялась камера Горяева. Этот метод сохраняет все положительные стороны метода пластинок обрастания и обладает вместе с тем рядом преимуществ по сравнению с последним.

Главное из них заключается в том, что наблюдения за развитием первичного микроценоза проводятся в условиях, близких к естественным, и не искажают истинную картину. Наблюдения за микроорганизмами перифитона можно проводить в течение долгого вре-

мени, при этом глубина прорези камеры может быть соответственно увеличена. При необходимости изучать перифитон больших глубин моря и во избежание попадания на камеры посторонних частиц их следует помещать в прибор Ю.И.Сорокина (1963). Конструкция его такова, что пластинки до заданного горизонта водной толщи идут закрытыми, затем выдвигаются отсюда и после определенной экспозиции снова закрываются до подъема их на поверхность.

Л И Т Е Р А Т У Р А

- Д у п л а к о в С.Н. Исследование процесса обрастания в Глубоком озере. - В кн.: Тр. Гидробиол. ст. на Глубоком озере, 6, 2-3, 1925.
- К о р з и н к и н Г.С. К изучению бактериального перифитона. - В кн.: Тр. Лимнолог. ст. в Косине, 17, 1934.
- П е р ф и л ь е в Б.В. и Г а б е Д.Р. Капиллярные методы исследования "микроорганизмов. М.-Л., 1961.
- Р о д и н а А.Г. Методы микробиологического исследования водоемов. - В кн.: Жизнь пресных вод СССР, 4, I. "Советская наука", М.-Л., 1956.
- С о р о к и н Ю.И. Об истинной природе нового класса микроорганизмов *Krassilnikoviae* (Крисс). - Микробиология, 32, 3, 1963.
- Т е л к о в а Л.А. Новые данные о способе захвата пищи хоботковых жгутиконосцев из рода *Rhynchomonas*. - Зоол. журнал, 43, 4, 1964.
- H e n r i c i A. Studies of freshwater bacteria. I. A direct microscopik technique. - Jour. Bact., 25, 1933.
- H e n t s c h e l A. Ergebnisse der Biologischen Untersuchungen über die Verunreinigung der Elbe bei Hamburg. - Ibid, 33, 1917.

О СПОСОБАХ ХРАНЕНИЯ МУЗЕЙНЫХ КУЛЬТУР МОРСКИХ ПЕРИФИТОННЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ С ПОВЕРХНОСТИ ПРОТИВООБРАСТАЕМЫХ КРАСОК

Ю.А.Горбенко

В настоящее время для хранения музейных культур бактерий применяют несколько методов. Наиболее распространенный из них является лиофилизация - высушивание в замороженном состоянии.