

УДК 581.526.325 : 574.34 (262.5)

О. А. ЮНЕВ, Н. В. САЛДАН, З. З. ФИНЕНКО,
В. В. ЗЕНИН, И. И. БАБИЧ**АНАЛИЗ ЧЕРНОМОРСКОГО ФИТОПЛАНКТОНА МЕТОДОМ
ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ**

Трудоемкость измерения численности и биомассы фитопланктона в области минимальных размеров клеток водорослей стимулирует поиск новых средств и методов установления размерной структуры микропланктонных сообществ. На современном этапе научных гидробиологических исследований таким методом может быть проточная цитофлуориметрия. В период экспедиции в апреле 1988 г. на борту НИС «Академик Вернадский» впервые были проведены определения некоторых элементов размерной структуры черноморского фитопланктона с использованием макета проточного цитофлуориметра, созданного на базе люминесцентного микроскопа серии ЛЮМАМ. Показано, что проточный цитофлуориметр является идеальным счетчиком для измерения численности одноклеточных водорослей размерами 1—150 мкм. Наличие линейной зависимости между величиной импульса флуоресценции хлорофилла «а» и объемом клетки представляет возможность использовать прибор и для исследования размерной структуры фитопланктона. С помощью проточного цитофлуориметра показано, что применение для этих целей мембранных фильтров не дает реальной картины. Численность фракций фитопланктона размерами <3, 3—5 и >5 мкм, полученная по данным проточной цитофлуориметрии, составляла в среднем для верхнего слоя 0—20 м соответственно 71, 19 и 10%, для горизонта 50 м — 55, 20 и 25%. Вклад размерных групп по биомассе противоположен тому, что получается по численности. В верхнем 20-метровом слое фракции <3, 3—5 и >5 мкм по биомассе составили соответственно 6, 3 и 91%, а на горизонте 50 м — 2, 1 и 97%.

Анализ литературных данных по исследованию размерной структуры фитопланктонных сообществ показывает, что оценка численности и биомассы, особенно в области минимальных размеров клеток водорослей, до настоящего момента остается наиболее трудоемкой. Подобное обстоятельство связано прежде всего с тем, что прямое микроскопирование требует больших затрат человеческого труда, а фракционирование с помощью мембранных фильтров не приводит к корректным результатам.

Проточная цитофлуориметрия [12], которая впервые применена нами для исследования численности и размерной структуры фитопланктона, на наш взгляд, обладает определенными преимуществами перед ранее использованными методами, так как с ее помощью можно регистрировать в автоматическом режиме клетки и частицы размерами от 1 мкм. Такие измерения были проведены на борту НИС «Академик Вернадский» в период экспедиции в восточную часть Черного моря в апреле 1988 г. Цель исследований — определение некоторых элементов размерной структуры черноморского фитопланктона с использованием макета проточного цитофлуориметра, а также сопоставление результатов измерения численности и биомассы фитопланктона, получаемых различными методами.

Материал и методы исследования. Пробы морской воды отбирали батометром проточного типа с горизонтов в слое 0—20 и 50 м на станциях, располагавшихся в квадрате с координатами 37—40° з. д., и 42—44° с. ш. Часть проб анализировали без сгущения, а часть подвергали сгущению до 50—70 мл методом обратной фильтрации на отечественные нуклеопоровые фильтры с диаметром пор 0,45 мкм. Параллельно с анализом проб на проточном цитофлуориметре проводили прямое микроскопирование.

Зависимость интенсивности флуоресценции отдельных клеток водорослей от их размеров исследовали на культурах водорослей 15 видов (табл. 1). Размеры клеток водорослей, среди которых были диатомовые, пиропитовые, зеленые, золотистые, коколиты-

Типы водорослей, на которых была получена зависимость интенсивности флуоресценции отдельных клеток от их размеров

Название водоросли	Средние размеры клетки мин×макс, мкм	Средний объем клетки, мкм ³	Сокращенное название
<i>Monochrysis lutheri</i>	2,2×3,1	10	Mo
Мелкие жгутиковые	2,0×3,0	8	Ms ₁
<i>Nephrochloris salina</i>	2,7×5,5	20	Ne
<i>Phaeodactylum triconutum</i>	2,0×5,4	51	Ph
<i>Dunaliella salina</i>	4,5×9,8	78	Du
Мелкие жгутиковые	3,0×5,4	85	Ms ₂
<i>Porphyridium cristum</i>	6,0×7,0	180	Po
<i>Platymonas viridis</i>	3,0×6,0	270	Pl
<i>Gymnodinium kowalevskii</i>	6,1×13,5	210	Gk
<i>Gymnodinium lanskaya</i>	10,0×11,5	510	Gl
<i>Exuviaella cordata</i>	13,5×16,2	1766	Wz
<i>Olisthodiscus luteus</i>	8,1×13,5	350	Ol
<i>Coccolithux huxleyi</i>	4,7×5,4	660	Co
<i>Peridinium triguetrum</i>	18,0×26,0	3306	Pe
<i>Peridinium trochoideum</i>	20,0×32,0	5024	Pt

фориды и мелкие жгутиковые, колебались от 2 до 32 мкм, а объемы соответственно от 8 до 5000 мкм³.

Биомассу выражали в единицах $C_{орг}$ и рассчитывали по уравнениям Стретмена [11]. Для фракций <3 и 3—5 мкм это было простое перемножение количества клеток в каждой фракции на количество углерода в одной клетке. Средний объем клеток рассчитывали для каждой фракции, исходя из того, что объемы клеток в этих фракциях колебались незначительно. Иначе обстояло дело с фракцией >5 мкм, в которой объемы клеток по данным прямого микроскопирования колебались в среднем от 60 тыс. до 500 тыс. мкм³. Для того чтобы рассчитать биомассу и этой фракции, была исследована ее размерная структура по данным прямого микроскопирования в каждом конкретном случае. На рис. 1 показано распределение клеток размерами >5 мкм на примере одной из станций. Таким образом, с помощью прямого микроскопирования мы могли оценивать долю клеток (%) с определенными объемами от общего количества клеток с размерами >5 мкм. Зная общее количество клеток и распределение клеток по объемам во фракции >5 мкм, можно рассчитать суммарную биомассу фитопланктона.

Следует отметить, что в случае культур было полное соответствие между результатами двух методов учета численности клеток водорослей, а для морского фитопланктона

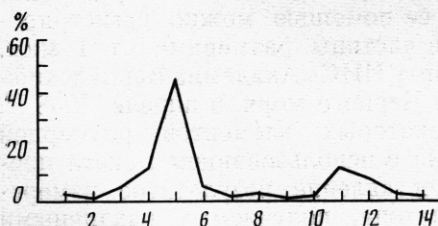


Рис. 1

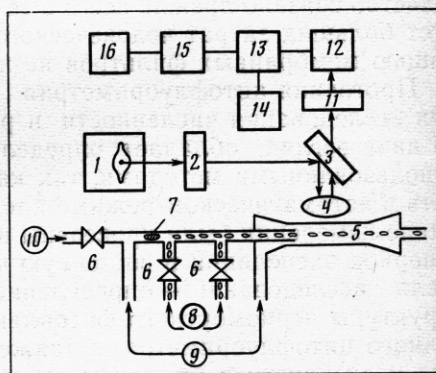


Рис. 2

Рис. 1. Гистограмма распределения клеток фитопланктона в соответствии с их объемами на станции 5, полученная по данным прямого микроскопирования

По вертикали — доля клеток с определенным объемом, % от общей численности клеток с размерами >5 мкм. По горизонтали — диапазоны объемов (мкм³) клеток с размерами >5 мкм: 1 — 60—150; 2 — 150—500; 3 — 500—10³; 4 — 10³—1,5 · 10³; 5 — (1,5—2) · 10³; 6 — (2—3) · 10³; 7 — (3—5) · 10³; 8 — 5 · 10³—10⁴; 9 — 10⁴—1,5 · 10⁴; 10 — (1,5—2) · 10⁴; 11 — (2—2,5) · 10⁴; 12 — (2,5—5) · 10⁴; 13 — 5 · 10⁴—10⁵; 14 — 10⁵—5 · 10⁵

Рис. 2. Блок-схема макета проточного цитофлуориметра

1 — лампа ДРШ-250-2; 2 — синий светофильтр; 3 — призма; 4 — объектив; 5 — капилляр; 6 — клапаны; 7 — пузырек воздуха; 8 — проба; 9 — оболочечная жидкость; 10 — воздух; 11 — красный светофильтр; 12 — ФЭУ-79; 13 — предусилитель; 14 — осциллограф; 15 — АИ-1024; 16 — цифрпечать или ДВК-3

данные, полученные на приборе, были в среднем в 2,5 раза выше, чем полученные методом прямого микроскопирования.

Отдельного рассмотрения требует также вопрос об учете колониальных форм фитопланктона, которые могут доминировать в определенные моменты в Черном море. В этой связи следует отметить, что одним из условий использования проточных цитометров является то, что исследуемые объекты должны представлять собой суспензию, состоящую из одиночных частиц или организмов [12]. Проведенные нами лабораторные исследования на культурах водорослей показали, что, во-первых, цепочки клеток, входя в капилляр, вытягиваются в длину и, как правило, колонии, состоящие из более чем 10 клеток, разбиваются на несколько отдельных цепочек и, во-вторых, образовавшиеся короткие цепочки регистрируются прибором как отдельные большие клетки. Появление в некоторых пробах морской воды в период экспедиции колониальных форм *Nitzschia segriata* и *Nitzschia delicatissima* контролировали прямым микроскопированием и в оценку численности и биомассы вносили соответствующие поправки. Следует также отметить, что авторы настоящей работы считают возможным «научить» проточный цитофлуориметр разделять сигналы от единичных клеток фитопланктона и цепочек, определенная работа в этом направлении проводится в настоящее время.

Макет проточного цитофлуориметра для количественного анализа планктонных водорослей был собран на базе люминесцентного микроскопа серии ЛЮАМ (рис. 2). Основным узлом прибора является проточная система, позволяющая создавать узкий поток жидкости, настолько узкий, что клетки образца выстраиваются друг за другом в единичный жгут и анализируются каждая в отдельности. Этого удается добиться гидродинамической фокусировкой образца в центре оболочечной жидкости [7]. Выстроившиеся клетки проходят в измерительную зону оптической системы. Импульсы флуоресценции хлорофилла «а» через ФЭУ подаются на анализатор импульсов (АИ-1024), на экране которого фиксируется распределение импульсов флуоресценции по их величине. Применение АИ представляет возможность накапливать данные, полученные многократным повторением анализа пробы и, следовательно, увеличивать объем выборки до требуемых размеров.

Существенным для нас дополнением к макету проточной системы, разрабатываемой в Институте цитологии АН СССР для работы с клетками млекопитающих, явилось введение в систему пузырька воздуха, который ограничивал перемешивание пробы морской воды с оболочечной жидкостью (обычно дистиллированной водой) и позволял пропускать через капилляр строго фиксированный объем пробы, что давало возможность рассчитывать количество клеток в единице объема. Объем анализируемой пробы составлял 0,1 мл, расход жидкости 0,05 мл/мин и диаметр капилляра ~300 мкм.

Определение концентрации хлорофилла «а» проводили экстрактным флуориметрическим методом [4]. Концентрацию хлорофилла «а» рассчитывали по формуле Лоренцена [6]. Входящие в формулу константы получали с использованием хроматографически чистого хлорофилла «а» непосредственно для нашего флуориметра.

Зависимость интенсивности флуоресценции отдельных клеток водорослей от их размеров. Распределение импульсов флуоресценции хлорофилла «а», полученное от любой исследованной культуры, представляло собой хорошо сформированный пик. Анализ смеси небольшого числа видов водорослей (как правило, не больше трех) также давал на экране АИ соответствующее число пиков с хорошим разрешением (рис. 3, а). При этом последовательность расположения пиков всегда соответствовала среднему размеру (объему) клеток каждого вида водорослей.

Для всех исследованных видов линейная зависимость между объемом клетки (Y , мкм³) и величиной импульса флуоресценции хлорофилла «а» (X , мВ) выражалось уравнением $Y = 0,32X - 256$ ($r = 0,91$, $N = 15$). Однако если поместить индивидуальные спектры всех культур водорослей на одну гистограмму, то получаем картину, представленную на рис. 3, б. Из рисунка видно, что близко стоящие пики перекрываются полностью, но весь спектр можно разбить на пять участков, которые соответствуют диапазонам объемов клеток, мкм³: 8—14, 15—80, 81—200, 201—1000 и >1000, что соответствует линейным размерам, мкм: <3, 3—5, 5—10, 10—20 и >20.

Проверку работы проточного цитофлуориметра производили путем сопоставления результатов, полученных одновременно на приборе и прямым микроскопированием, которое проводили несколько исследователей. Как правило, расхождения между результатами таких определений численности не превышали 5%. Коэффициент вариации повторных измерений численности клеток на проточном цитофлуориметре (при численности больше 1000 кл/мл и количестве измерений больше 5) составлял не более 1%.

Численность и биомасса черноморского фитопланктона в различных размерных фракциях. Размерный спектр численности фитопланктона

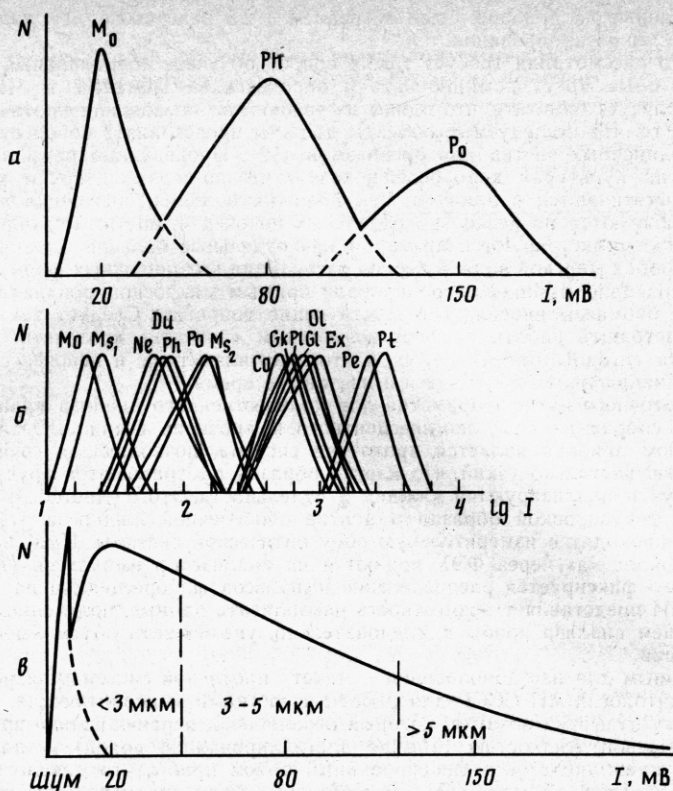


Рис. 3. Гистограмма распределения импульсов флуоресценции хлорофилла «а»

а — спектры смеси трех культур водорослей; б — наложение спектров всех исследованных культур водорослей на одну гистограмму; в — спектр морского фитопланктона. I — величина импульса флуоресценции хлорофилла «а», мВ; N — число событий в канале

представляет собой спадающую кривую с максимумом в области минимальных размеров (рис. 3, в). Рассматривали три размерные фракции, мкм: <3 , $3-5$ и >5 . Диапазоны размеров на гистограмме были выбраны согласно результатам опытов на культурах водорослей (рис. 3, б). Анализ несгущенных проб морской воды показал, что, как правило, количество клеток с размерами >5 мкм составляло единицы, тогда как клеток с размерами <5 мкм — десятки и сотни в 0,1 мл. Поэтому определение размерной структуры фитопланктона проводили в сгущенных пробах, концентрируя 3—5 л морской воды и повторяя анализ проб 4—5 раз. Таким образом, получали достаточное количество клеток с размерами >5 мкм, с тем чтобы судить о представительности выборки [1]. Результаты анализа сгущенных проб морской воды представлены в табл. 2.

Для верхнего исследованного слоя 0—20 м численность фракций <3 , $3-5$ и >5 мкм составляла в среднем при небольших разбросах значений соответственно 71, 19 и 10%. Для горизонта 50 м — 55, 20 и 25%. Из табл. 2 также видно, что вклад размерных групп по биомассе и численности противоположен. В верхнем 20-метровом слое фракции <3 , $3-5$ и >5 мкм по биомассе составляли соответственно 6, 3 и 91%, а на горизонте 50 м — 2, 1 и 97%. Следует отметить, что по биомассе и численности наблюдается увеличение количества крупных клеток с глубиной.

Несомненный интерес представляет отношение органического углерода к хлорофиллу «а» в природных условиях. Результаты определения этого отношения, полученные по данным проточной цитометрии и методом прямого микроскопирования (табл. 3), показывают, что значения, полученные с использованием прибора, очень близки к результатам, которые были установлены для культур черноморских планктонных водо-

Таблица 2

Общая численность и вклад (%) различных размерных фракций в общую численность и биомассу ($C_{орг}$) фитопланктона восточной части Черного моря

№ станции	Координаты		Общая численность, кл./л	Вклад в численность фракции, мкм			Вклад в биомассу, мкм		
	с. ш.	в. д.		<3	3—5	>5	<3	3—5	>5
Слой 0—20 м									
1	42°30'	37°30'	172 111	70	21	9	5	3	92
2	43°00'	37°45'	281 848	67	22	11	2	1	97
3	43°59'	38°30'	982 060	73	20	7	11	5	84
4	43°30'	38°30'	200 446	67	23	10	9	5	86
5	43°30'	39°15'	348 250	67	14	19	3	1	96
6	43°00'	38°30'	172 926	84	12	3	7	2	91
X				71	19	10	6	3	91
K				9	24	50	58	61	6
Горизонт 50 м									
1			149 040	45	23	32	1	1	98
2			253 421	55	23	23	1	1	98
4			216 065	64	15	21	3	1	96
X				55	20	25	2	1	97
K				17	23	23	58	0	1

Примечание. X — среднее значение, K — коэффициент вариации (%).

Таблица 3

Отношение органического углерода (C) к хлорофиллу «а» (A) в фитопланктоне Черного моря

№ станции	А, мкг/мл	Проточная цитофлуориметрия		Прямое микроскопирование	
		С, мкг/мл	С:А	С, мкг/мл	С:А
Горизонты 0—20 м					
1	0,20	6,9	35	4,3	21
2	0,22	25,4	116	16,7	75
3	0,41	17,7	43	8,5	21
4	0,27	4,4	16	1,3	5
5	0,56	22,2	40	7,1	13
6	1,25	8,8	7	4,0	3
Горизонт 50 м					
1	0,69	21,7	32	13,0	19
2	0,66	36,8	56	14,5	22
4	0,94	12,2	13	12,7	13

рослей, выращенных при оптимальных условиях минерального питания и освещения [2]. По данным прямого микроскопирования это отношение в среднем в 2,5—3 раза ниже, что отражает различия в численности, измеренной разными методами.

Сопоставление результатов фракционирования морского фитопланктона с использованием нуклеопоровых фильтров и по данным проточного цитофлуориметра. Определение хлорофилла «а» в различных фракциях планктона с использованием для фракционирования мембранных фильтров «Сынпор» [5] показало, что довольно часто наблюдались случаи, когда величины концентрации хлорофилла на фильтрах с диаметром пор 0,85 мкм были больше, чем на фильтрах с диаметром пор 0,23; 0,4; 0,4 и 0,6 мкм (рис. 4, а). Подобное обстоятельство может быть объяснено тем, что диаметр пор фильтров, используемых для фракционирования, не соответствует диаметру клеток, которые задерживаются этими фильтрами. Имея возможность счета клеток на проточном цитофлуориметре, были проведены подсчеты клеток водорослей в сгущенных пробах морской

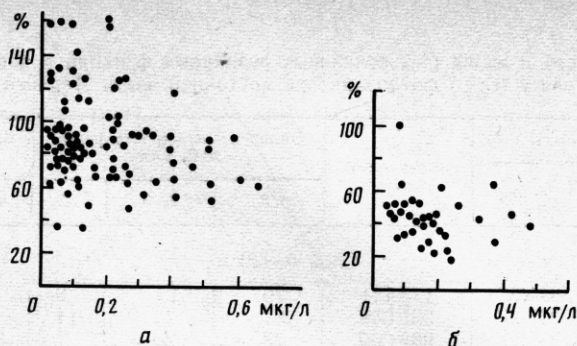


Рис. 4. Зависимость между концентрацией хлорофилла «а» (мкг/л) и % хлорофилла «а» на фильтрах с диаметром пор 0,85 (а) и 2,5 мкм (б) от максимального значения концентрации, получаемой на фильтрах с диаметром пор 0,23—0,6 мкм (данные, полученные в 20-м рейсе НИС «Профессор Водяницкий» [6])

воды при фракционировании обратной фильтрацией на нуклеопоровые фильтры с диаметром пор 0,45—2,5 мкм.

Проведенные исследования выявили два основных момента. Во-первых, как и в случае с нитроцеллюлозными, на нуклеопоровых фильтрах не было получено статистически значимых различий в биомассе фракций 0,45; 0,6 и 1,0 мкм. Дальнейшее сопоставление результатов фракционирования двумя методами будет проводиться только для фракций <2,5 и >2,5 мкм, для которых, как и в случае нитроцеллюлозных фильтров (рис. 4, б), такие различия были получены. В табл. 4 приведен характерный пример такого сопоставления, полученный на одной из станций. Из таблицы следует, что если ранее проводя фракционирование на мембранных фильтрах, мы условно принимали, что клетки фитопланктона, проходящие через фильтры с диаметром пор 2,5 мкм и задерживающиеся на фильтрах с диаметром пор 0,2 — 0,85 мкм, и есть пикопланктон [3, 5], то расшифровка этих фракций на проточном цитофлуориметре показывает, что во фракции, прошедшей через фильтр с диаметром пор 2,5 мкм, 77,5% биомассы составляют клетки с размерами >5 мкм. По всей видимости мембранные фильтры с диаметром пор 2,5 мкм пропускают крупные клетки в значительном количестве и, следовательно, фракционирование на них не приводит к реальным данным о содержании пикопланктона в море.

Неадекватность обозначенного размера пор на фильтрах и размеров разделяемых клеток водорослей была показана практически для всех типов используемых для фракционирования мембранных фильтров и сит [8, 9]. Следует также отметить, что Стокнер и Анти [10] после детального анализа эффективности метода фракционирования с использованием различных мембранных фильтров приходят к заключению, что идеальной техникой для разделения частиц по размерам на современном этапе научных исследований может быть только проточный цитометр.

Таблица 4

Сопоставление результатов определения биомассы размерных фракций фитопланктона различными методами

Фракционирование на нуклеопоровых фильтрах		Проточная цитофлуориметрия			
фракция, мкм	% от суммы	вклад (%) фракций, мкм			% от суммы
		<3	3—5	>5	
≥2,5	81,6	2,0	1,2	96,8	98,8
<2,5	18,4	18,6	3,8	77,6	1,2

Таким образом, результаты исследования черноморского фитопланктона, полученные с использованием проточного цитофлуориметра позволяют сделать заключение, что этот прибор может быть идеальным счетчиком одноклеточных водорослей размерами 1—150 мкм. Наличие линейной зависимости между величиной импульса флуоресценции хлорофилла «а» и объемом клетки предоставляет возможность применять проточный цитофлуориметр и для исследования размерной структуры фитопланктона, тогда как применение для этих целей мембранных фильтров не дает реальной картины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кольцова Т. И., Конопля Л. А., Максимов В. Н., Федоров В. Д. К вопросу о представительности выборок при анализе фитопланктонных проб//Гидробиол. журн. 1971. Т. 7. № 3. С. 109—116.
2. Чмыр В. Д., Берсенева Г. П. Содержание углерода и хлорофилла в планктонных водорослях//Экология. 1983. № 5. С. 19—25.
3. Юнев О. А. Пространственное распределение хлорофилла «а» и феофитина «а» в западной части Черного моря в зимний период//Океанология. 1989. Т. 29. № 3. С. 480—485.
4. Юнев О. А., Берсенева Г. П. Флуориметрический метод определения концентрации хлорофилла «а» и феофитина «а» в фитопланктоне//Гидробиол. журн. 1986. Т. 22. № 2. С. 102—108.
5. Юнев О. А., Салдан Н. В. Распределение содержания хлорофилла и феофитина в размерных фракциях планктона тропической зоны Атлантического океана//Пикофракция в составе планктона тропической зоны Атлантического океана. Севастополь, 1987. С. 77—102.— Деп. в ВИНТИ 14.07.87, № 5054.
6. Lorenzen C. J. A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration//Deep-Sea Res. 1966. V. 13. P. 223—227.
7. Olson R. J., Frankel S. L., Chisholm S. W. An inexpensive flow cytometer for the analysis of fluorescence signals in phytoplankton: chlorophyll and DNA distributions//J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1983. V. 68. P. 129—144.
8. Sheldon R. W. Size separation of marine seston by membrane and glass-fiber filters//Limnol. Oceanogr. 1972. V. 17. P. 494—498.
9. Sheldon R. W., Sutcliffe W. H. Retention of marine particles by screens and filters//Limnol. Oceanogr. 1969. V. 14. P. 441—444.
10. Stockner J. G., Antia N. J. Algal picoplankton from marine and freshwater ecosystems: a multidisciplinary perspective//Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1986. V. 43. P. 2472—2503.
11. Strathmann R. R. Estimating the organic carbon content of phytoplankton from cell volumes or plasma volumes//Limnol. Oceanogr. 1967. V. 12. P. 411—418.
12. Yentsch C. M., Cucci T. L., Phinney D. A. Flow cytometry and cell sorting: problems and promises for biological ocean science research//Marine phytoplankton and productivity: Lecture notes on coastal and estuarine studies. Berlin; Heidelberg; New York; Tokyo: Springer-Verlag, 1984. P. 141—155.

Институт биологии южных морей
АН УССР, Севастополь

Поступила в редакцию
15.III.1989
После доработки
10.V.1989

O. A. YUNEV, N. V. SALDAN, Z. Z. FINENKO, V. V. ZENIN, I. I. BABICH

ANALYSIS OF THE BLACK SEA PHYTOPLANKTON BY FLOW CYTOFLUORIMETRY METHOD

Using results of R/V «Akademik Vernadsky» cruise in April 1988, it is shown that the flow cytofluorimeter is an ideal counter for measurements of quantity of single-celled algae with sizes from 1 to 150 μm . Linear dependence between pulse value of chlorophyll «а» fluorescence and the cell volume gives possibility to use the instrument also for study phytoplankton size structure. Quantity of phytoplankton fractions with sizes <3 , 3—5 and $>5 \mu\text{m}$, obtained by flow cytofluorimetry method, was, correspondingly, 71, 19 and 10% for upper 0—20 m layer, and 55, 20 and 25% for horizon 50 m. Contribution of size groups in accordance with biomass is opposite to that obtained in accordance with quantity. The fractions <3 , 3—5 and $>5 \mu\text{m}$ in accordance with biomass were, correspondingly, 6, 3 and 91% for the upper 20 m layer, and 2, 1 and 97% for horizon 50 m.