

18

АКАДЕМИИ НАУК УССР
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ им. А.О.КОВАЛЕВСКОГО
ОДЕССКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ

Б.Г.АЛЕКСАНДРОВ, О.А.АБЛОВ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОМУ УЧЕТУ
ЖИВЫХ И МЕРТВЫХ ОРГАНИЗМОВ МОРСКОГО ЗООПЛАНКТОНА

Одесса - 1987

Проблема изучения физиологического состояния животных и растений на клеточном и организменном уровне имеет относительно давнюю историю. Во многих областях биологии, в частности, цитологии, гистологии и физиологии, она является ключевой и потому с методической стороны решена достаточно основательно.

Гораздо в меньшей степени разработаны методические основы дифференцированного учета живых и мертвых организмов в гидробиологии, хотя важность данного вопроса в исследованиях водных экосистем очевидна. При изучении зоопланктона учет отмерших организмов оказывается необходимым для оценки продукционных характеристик пелагиалей, пространственного распределения организмов, выявления районов с различным уровнем загрязнения и т.д.

Особую остроту данная проблема приобретает при исследовании активной поверхности Мирового океана, в частности нейстали /1/.

Наиболее распространенным способом оценки физиологического состояния водных беспозвоночных, а также клеток животных и растительных организмов является окрашивание красителями различной химической природы. Существующие в настоящее время методы дифференцированного окрашивания зоопланктона обладают рядом существенных недостатков:

1. чрезмерная длительность окрашивания /10/
2. невозможность анализа животных различных таксонов в одной пробе /3, 10/
3. ограничение области применения красителя пресными водами /11/
4. завышение показателей смертности, вызванное гибелью животных в красителе /3, 11/
5. невозможность вести быструю дифференциацию на массовом материале /2, 4/.

Применение флуоресцентных красителей с последующим анализом материала в УФ-свете в практике гидробиологических исследований остается без должного внимания. Несмотря на широкое применение данного метода в гистологии /5/, флуоресцентная микроскопия в гидробиологических исследованиях применяется лишь для анализа микроорганизмов и одноклеточных водорослей /6, 12/. Попытки применения флуоресцентных красителей в исследованиях морских капепоид положительных результатов не дали /10/.

Александров Б.Г., Аблов О.А.

Отдел гидробиологии активных поверхностей моря

Предлагаемый метод окрашивания животных акридиновым оранжевым позволяет разрешить большинство трудностей и обладает достаточно простой техникой применения. Время подготовительных операций составляет в среднем 15 минут. Метод позволяет вести дифференцированный учет организмов различных систематических групп в одной пробе. Низкая концентрация красителя предотвращает гибель особей при окрашивании.

Реактивы:

- 1% раствор акридинового оранжевого на дистиллированной воде /исходный раствор/
- 1/15 М раствор KH_2PO_4
- 1/15 М раствор Na_2HPO_4
- формалин нейтрализованный 40%.

Оборудование:

- микроскоп стереоскопический МБС-9
- осветитель люминисцентный ОИ-18
- камера Богорова
- шпатель-пипетка
- стаканчики с дном из мельничного сита необходимого номера
- бюкса
- емкости для проб
- микропипетка для внесения красителя.

Окрашивание:

В свежесобранную пробу живого зоопланктона объемом 50 мл вносят 0,01 мл 1%-ого исходного раствора акридинового оранжевого /концентрация красителя в пробе составляет 0,0002% / и экспонируют в течение 10 минут. При помощи стаканчиков с ситом зоопланктон переносят в буферный раствор /1 часть 1/15 М раствора KH_2PO_4 + 4 части 1/15 М раствора Na_2HPO_4 / и выдерживают в течение 2 мин. Затем зоопланктон промывают морской водой 1 мин и переносят в консервирующий раствор /5 мл 40% нейтрализованного формалина + 5 мл буферного раствора/. Объем пробы доводят морской водой до 55 мл. Срок хранения проб в холодильнике 3-5 недель.

Дифференциация.

Дифференцированный учет зоопланктона проводится непосредственно в счетной камере Богорова под бинокляром МБС-9 при увеличении 2х8. Дифференциация особей на живые и мертвые осуществляется путем визуальной оценки различий характера свечения окрашенных

флуорохромом животных при воздействии на них УФ-света /табл. I/

Таблица I.

Особенности окрашивания живых /ж/ и умерщвленных/у/ организмов после 10 минутного выдерживания в 0,0002 % растворе акридинового оранжевого / T=19-21°C/

Организмы		Участки накопления	Характер свечения
класс	вид	красителя	при освещении УФ-светом
Mastigophora	Noctiluca miliaris	ж ядро, тяжки цитоплазмы, оболочка	Ж-З. т. н. *
		у отсутствуют	о.
Turbellaria	Sp. 1	ж все тело, кроме центральной внутренней части	З. я. н.
		у отсутствуют	о.
Rotatoria	Synchaeta baltica	ж желточник, яйца	З. я. н.
		у отсутствуют	о.
Polychaeta (larvae)	Polydora ciliata	ж все тело, кроме желудка	З. я. н.
		у пальпы, параподии, пилгидий	о., либо Ж-З. т. н.
	Spio filicornis	ж все тело, кишка, пилгидий	З. я. р.
		у отсутствуют	о.
	Harmothoe imbricata	ж все тело	З. я. р.
		у щетинконосные мешки, головной и брюшной мозг	о., либо З. т. н.
Crustacea	Pleopis polyphemoides	ж выводковая камера, яичник, кишечник, затылочный орган	З. я. н.
		у отсутствуют	о.
	Harpacticoida	ж кожный эпителий, антенны I, плеоподы	З. я. н.
у антенны I, плеоподы		о., либо З. т. н.	
	Oithona minuta (copepodita)	ж плеоподы, abdomen, яичник, генит. поры	З. я. н.
у отсутствуют		о.	
	O. minuta (nauplius)	ж все тело	З. я. р.
у отсутствуют		о.	
	Acartia clausi (nauplius)	ж все тело	З. я. р.
у отсутствуют		о.	
	A. clausi (copepodita)	ж антенны I, плеоподы	З. я. н.
у концевые части антенн, фурка		о. либо З. т. н.	

* Примечание: З-зеленое, Ж-желтое, я-яркое, т-тусклое, о-отсутствует, р-равномерное, н-неравномерное.

В качестве источника возбуждения использовалась установка ОИ-18 с ртутно-кварцевой лампой СВД-120А. Применение лампы СВДШ-250 повышает эффективность возбуждения люминесценции в 3-4 раза /8/. Для получения возбуждающего света нужной длины волны между лампой и конденсором помещается светофильтр ФС-1. При этом лампа размещается таким образом, чтобы свет падал непосредственно на объект. Во избежание повреждения глаз над окулярами устанавливаются желтые запирающие светофильтры ЖС-3 и ЖС-18 /5,7/. Наиболее контрастного изображения добиваются в затемненном помещении.

Интенсивность накопления красителя в организме живых особей тесным образом связана с их физиологическим состоянием. В связи с этим перспективно использовать данный метод для более детальной оценки активности гидробионтов. Это может быть реализовано с помощью приборов, регистрирующих интенсивность свечения. /микроспектрофлуориметр МОФ-1/ /9/.

Предлагаемая методика позволяет вести дифференцированный учет зоопланктона в экспедиционных и стационарных условиях. Отношение численности мертвых животных к их общему количеству может служить индикатором качества среды, что приобретает особое значение при изучении последствий хозяйственной деятельности человека на морские экосистемы. Кроме этого, настоящий метод может найти широкое применение в различного рода токсикологических исследованиях при определении критерия токсичности.

Список использованной литературы.

1. Зайцев Ю.П. 1980. Морская нейстонология - К.: Наукова думка, 264 с.
2. Зелезинская Л.М. 1968. К изучению естественной смертности некоторых организмов пелагиали Черного моря. - В кн.: Экологическая биогеография контактных зон моря, К.: Наукова думка, с. 135-147.
3. Иванов В.Б. 1982. Активные красители в биологии. - М.: Наука, 224 с.
4. Кастальская-Карзинкина М.А. 1937. Опыт применения метода учета живых и отмерших компонентов в изучении планктона Глубокого озера. - Тр. лимнолог. ст. в Косине, 21, с. 143-170.
5. Лилли Р. 1969. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. - М.: Мир, 645 с.

6. Сажин А.Ф. 1936. Летний бактериопланктон в юго-западной части Тихого океана. - Тез. докл. 5 съезда ВГБО, Тольятти, 15-19 сент. 1936, ч. I, с. 33-35.
7. Скворцов Г.Е., Панов В.А., Поляков Н.И., Федин Л.А. 1969. Микроскопы. - Л.: Машиностроение, 512 с.
8. Мельзель М.Н., Кабанова Е.А., Левина Е.Н., Страхова Л.А. 1968. О некоторых новых возможностях применения люминесцентной микроскопии в микробиологии. - Известия АН СССР, Серия биологическая, 533-543.
9. Яшин В.А., Карнаухов В.Н. 1984. Микроспектральный анализ в морских биологических исследованиях. - Всоб.: Экология моря, 16, с. 65-71.
10. Dressel D.M., Heinle D.R., Grote M.C. 1972. Vital staining to sort dead and live Copepods. - Short papers and notes. Chesapeake Sci., 13 p. 156-159.
11. Seepersad B., Crippen R.W. 1978. Use of aniline blue for distinguishing between live and dead freshwater zooplankton. - J. Fish. Res. Board Can. 35, p. 1363-1366.
12. Wood E.J.F. 1955. Fluorescens microscopy in marine microbiology. - J. Conseil perman. intern. explorat. mer., 21, 1, p. 6-7.

Печатается в соответствии с решением Ученого Совета Одесского
Отделения Института биологии южных морей АН УССР от 27 октября
1987 года, протокол № 5 .

Ученый секретарь Совета
к.б.н., с.н.с

Л.Д.Каминская

БР 08588. Подп. к печати 20.11.87 г. Формат 60 x 84 1/16.
Объем 0,5 п. л. Заказ № 6942. Тираж 100 экз.
Гортипография Одесского обляэлигрфиз дата, цех № 3,
Ленина, 46.