

ОБЗОР МЕТОДОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО УЧЕТА ФИТОПЛАНКТОНА

А. М. Лях*, А. М. Суворов**, Ю. В.
Брянцева

*Институт Биологии Южных морей НАН
Украины
г. Севастополь, пр. Нахимова, 2
E-mail: anton@ibss.iuf.net

#Морской Гидрофизический Институт
НАН Украины
г. Севастополь, ул. Капитанская, 2
E-mail: suvorov@alpha.mhi.iuf.net

В работе рассмотрены основные методы отбора, концентрирования, подсчета численности и биомассы клеток фитопланктона, и приведены ориентировочные величины погрешностей результатов. Величины погрешностей будут использоваться при нормировке количественных данных о представителях фитопланктона.

Введение

Микроскопические одноклеточные водоросли (фитопланктон) играют определяющую роль в синтезе органического вещества в верхнем 100 метровом слое Мирового океана, и являются первым звеном трофической цепи.

Уже более 100 лет ученые занимаются исследованием фитопланктона. За это время в различных научно-исследовательских организациях накоплены огромные массивы информации. Однако единой интегрированной компьютерной базы данных наблюдений за фитопланктом к настоящему времени, к сожалению, не существует. Работы по созданию такой базы, как элемента банка океанологических данных Черного моря [1], в последние годы активно ведется в Институте Биологии Южных Морей и Морском Гидрофизическому Институте НАН Украины совместно с другими морскими институтами и центрами как Украины, так и других стран Черного моря.

За 100 летний период исследований методы наблюдений за фитопланктом неоднократно менялись. Вместе с методами изменялась точность оценки определяемых показателей. Поэтому, нельзя сопоставлять массивы разнородной информации о фитопланктоне, без учета погрешностей методик сбора и обработки проб фитопланктона.

В работе дан краткий обзор методов количественного учета фитопланктона с указаниями погрешностей полученных

результатов. При этом рассматриваются лишь те методы, для которых имеются литературные данные об их точности.

Отбор проб фитопланктона

При количественном учете фитопланктона рассчитывают его численность и живую массу (биомассу) в единице объема воды (л, м³) или под единицей площади поверхности (под м², га). Для отбора проб фитопланктона применяются как планктонные сети, так и батометры. В последнее время метод сетяного лова используется редко. Он, в первую очередь, предназначен для определения качественного состава всех групп фитопланктона, кроме самого мелкого - нанопланктона (размер клеток менее 2 мкм) [2]. Батометрический метод одинаково применим как для оценки качественных, так и количественных параметров фитопланктона. В некоторых случаях численность и биомасса нанопланктона может превышать численность и биомассу других групп микроводорослей [3], тогда сетяной лов приводит к заниженным результатам [2]. Барабашева Ю. М. с соавторами [4] выяснили, что в сетяных пробах количество клеток фитопланктона в среднем в 1,3 раза меньше, чем в батометрических пробах.

Концентрирование и фиксация проб

Из-за малого размера микроводорослей (менее 1 мм¹) невозможно учесть весь фитопланктон в пробе. Поэтому исследуют небольшие выборочные объемы воды - подпробы. Если плотность популяции фитопланктона велика, что наблюдается во время его "цветения", или если исследуются массовые формы микроводорослей (при экспресс-оценке), то количество клеток фитопланктона считают непосредственно в капле с живыми организмами (в "живой" капле). Для учета мелких жгутиковых водорослей, которые не выдерживают фиксации даже самым слабым химическим раствором [5;6], также используют этот метод. Чтобы увеличить вероятность попадания в каплю редких видов микроводорослей, искусственно повышают плотность популяции фитопланктона путем предварительного концентрирования (сгущения) пробы.

Для хранения пробы фитопланктона ее фиксируют специальными химическими растворами: раствором формалина, Люголя, Утермеля и др. [7;8]. Однако фиксация разрушает некоторые группы микроводорослей или искажает размеры клеток, что отражается

¹ Некоторые виды фитопланктона, например *Noctiluca miliaris*, могут достигать размеров до 2 мм

на учете их численности и биомассы. Исследования, проведенные Montagnes et al. [9], показали, что в пробах фиксированных 2% раствором Люголя, и исследованных под микроскопом, объем клеток уменьшается в 1,33 раза. К сожалению, фиксатор, который бы полностью предохранял клетки от разрушения, до сих пор не найден.

Кратко рассмотрим основные методы концентрирования фитопланктона и приведем оценки точности полученных результатов.

- **Метод осаждения (осадочный метод)** заключается в осаждении фиксированных организмов в высоких цилиндрах или бутылках, стоящих длительное время в затемненном месте [10]. За указанное время большая часть планктона оседает на дно. После отстаивания верхний слой воды, не содержащий осадок, сливают, а, оставшийся концентрат перемешивают и пипеткой отбирают часть материала для обработки. На качество осаждения фитопланктона оказывает влияние используемый фиксатор. При фиксации пробы раствором формалина синезеленые микроводоросли не оседают, а плавают на поверхности [5]. Поэтому результаты суммарного количественного учета фитопланктона в подобных пробах будут неполными. Разные исследователи приводят разные значения погрешности метода осаждения. На величину ошибки влияет качество перемешивания материала, при осторожном перемешивании концентрата погрешность равна 20%, при небрежном - 30% [7]. По-видимому, данные величины ошибок метода несколько занижены. По данным Сухановой И.Н. и Ратьковой Т.Н. [11], которые сравнили осадочный метод с методом обратной фильтрации [12], численность микроводорослей в пробах, сконцентрированных первым методом, составляет 60% (минимальное) - 85% (среднее) - 95% (максимальное) от численности фитопланктона в пробах, сгущенных вторым методом. Если погрешность метода обратной фильтрации составляет 20-25% [12], то погрешность метода отстаивания будет изменяться от 24% до 55%, и в среднем составит 32%-36%².

- **Метод центрифугирования** основан на механическом осаждении организмов под действием центробежной силы и обычно

применяется для концентрирования проб с невысокой плотностью микроорганизмов. При центрифугировании некоторые группы фитопланктона могут не осаждаться, а прилипать к стенкам сосуда или оставаться во взвешенном состоянии. Для их учета не содержащую осадок воду пропускают через газовую сеть, и задержанный материал анализируют вместе с концентратом. Javerricky (цит. по [5]) исследовал оптимальные скорости и время центрифугирования различных групп фитопланктона. По его данным клетки мелких жгутиковых водорослей разрушаются при центрифугировании со скоростью выше 2000 об/мин., либо при центрифугировании более 5 мин. Поэтому, данные о мелких жгутиковых водорослях, полученные подобным образом, нельзя считать достоверными. Погрешность метода центрифугирования в среднем составляет 30% [5].

- **Метод фильтрации** заключается в пропускании воды через фильтр. Существует два способа фильтрации. [13]. При первом способе пробу фильтруют до тех пор, пока вся вода не пройдет через фильтр, после чего организмы подсчитывают непосредственно на фильтре, либо фильтр растворяют и считают организмы в растворе. При втором способе над фильтром оставляют часть воды и фитопланктон смывают мягкой кисточкой, а потом просчитывают под микроскопом. При этом недоучиваются клетки, застрявшие на поверхности фильтра, поэтому фильтр также необходимо исследовать. Качество фильтрации зависит от типа используемого фильтра. Ранее, планктонологи применяли мембранные фильтры, сейчас - ядерные или нуклеопоровые. Основными недостатками метода фильтрации с помощью мембранных фильтров являются: разрушение организмов с тонкой оболочкой фильтрационным давлением, прилипание слизистых клеток к фильтру и деформация формы микроводорослей [6;13;14]. Нуклеопоровые фильтры лишены некоторых из перечисленных недостатков, но и они деформируют клетки фитопланктона. Ведерников В.И. и Микаэлян А.С. указывают, что при использовании нуклеопоровых фильтров с диаметром пор 0,5 мкм и 1 мкм потери клеток фитопланктона составляют около 20% [6;15]. В этом случае величина поправки на потерю клеток равна 1,25.

- **Метод обратной фильтрации** впервые предложили Thomas W.H., Dodson A.N. [16]. Сорокин Ю. И. [6;12] его модифицировал и создал удобную для работы в полевых условиях установку. Основным достоинством данного метода является то, что фильтрация происходит при небольшом давлении в направлении, обратном действию

² Погрешность осадочного метода вычислена следующим образом. Пусть метод обратной фильтрации сохранил 75% клеток фитопланктона. Тогда осадочный метод сохранит 60% (мин.) - 85% (средн.) - 95% (макс.) от 75%, то есть 45% (мин.) - 64% (средн.) - 71% (макс.) от общего количества клеток. Для определения погрешности метода отстаивания из 100% нужно вычесть приведенные величины и рассмотреть границы полученных интервалов.

гравитационных сил, что предохраняет клетки фитопланктона от разрушений и не позволяет им застревать в порах фильтрах. Метод обратной фильтрации позволяет задерживать на фильтре все группы микроорганизмов [5;6;12]. Потери клеток фитопланктона при использовании данного метода составляют 20-25%. Средняя величина поправки на потерю микроводорослей равна 1,27 [12].

- Комбинированный метод отличается от метода фильтрации тем, что пробу пропускают через два фильтра с разными диаметрами пор (первый фильтр – поры 50-100 мкм; второй фильтр – поры 1-2 мкм), а затем клетки просчитывают в отфильтрованном материале и непосредственно на фильтрах. Погрешность метода не превышает 15% [7].

Подсчет численности микроводорослей

Для подсчета численности фитопланктона каплю воды помещают в специальную счетную камеру [5;8;17]. Беляева Т.В. [18] сравнила численность представителей диатомовых микроводорослей, определенных в камерах Богорова и Наумана, и получила, что в камерах Наумана можно недосчитать целый ряд видов. Аналогичные исследования с камерами Нажотта и Багорова показали, что счет в камерах Нажотта приводит к завышению численности крупных клеток фитопланктона в 1,5 раза [4]. Таким образом, из анализа перечисленных источников следует, что недостоверными данными о крупных видах фитопланктона (размером более 50 мкм) следует считать те, которые получены при подсчете микроводорослей в камерах Наумана и Нажотта.

При подсчете количества клеток фитопланктона важен объем исследуемой пробы. Кольцова Т.И. с соавторами [19;20] указывают, что количественные данные о фитопланктоне являются репрезентативными, если проводился учет клеток из пробы воды, объемом не менее 100 мл.

Определение биомассы фитопланктона

Биомасса - это вес всех особей сообщества или популяции в единице объема воды или под единицей площади водной поверхности. Обычно она выражается в мг/м³ или мг/м².

Из-за очень малых размеров клеток фитопланктона измерить их вес непосредственно невозможно. Поэтому приходится прибегать к косвенным методам. Существует два основных способа определения биомассы фитопланктона: геометрический и биохимический. Первый основан на вычислении объемов микроводорослей. Второй базируется на косвенной оценке биомассы через значения концентрации органического

углерода, хлорофилла, протеинов, АТФ, нитратов или иных химических компонентов клетки. Не существует четкой функциональной зависимости между перечисленными компонентами и объемом клетки. Концентрация химических элементов в клетке фитопланктона зависит от тех условий, в которых она до этого находилась. Мы планируем дать обзор биохимических методов оценки биомассы в своих последующих работах.

Геометрические методы

Масса любого физического тела определяется произведением объема на плотность. Если предположить, что плотность клеток фитопланктона есть постоянная величина, примерно равная одной тысячной мг/мкм³ [21], то их масса численно будет равна их объему. Определив объем всех клеток фитопланктона в пробе, мы вычислим биомассу всего фитопланктонного сообщества. Рассмотрим методы определения объемов микроводорослей.

- Метод подобных фигур или метод "истинных" объемов, предложенный И. А. Киселевым [8] заключается в том, что форму клетки приравнивают к близкой ей геометрической фигуре или к комбинации фигур, а затем рассчитывают ее объем по известным формулам. Соответствия между фигурами и формой клеток приводятся в литературных источниках [22;23], которые были систематизированы при создании унифицированного списка видов [24]. Данный метод очень трудоемок, так как требует измерения характерных размеров каждой клетки фитопланктона в пробе, и, довольно неточен, так как форма клетки фитопланктона значительно отличается от соответствующего ей геометрического тела.

- Коэффициенты объемной полноты. Сеничкина Л.Г. для вычисления объемов микроводорослей предложила использовать "коэффициенты объемной полноты", которые уменьшают количество необходимых измерений до 1-3 [25], но не решают проблему точности. В этом случае коэффициенты объемной полноты равны отношению "истинного" объема, вычисленного по формуле объема соответствующей геометрической фигуры, к объему куба или параллелепипеда, со сторонами, равными линейным размерам клетки. Величины "истинных" объемов и объемы, полученные данным методом, отличаются на 0,4-4%. В отдельных случаях ошибка увеличивается до 10% и более, но не превышает 20%. Михеева [5] критикует данный метод. Она указывает на то, что размеры клеток фитопланктона сильно варьируют, поэтому применять единожды рассчитанные

коэффициенты общей полноты нельзя. В то же время многие планктонологи используют данный метод.

- **Уравнения регрессии.** Суханова И.Н. и Цейтлин В.Б. предложили определять объем клетки фитопланктона по 1-3 ее линейным размерам с помощью уравнения регрессии. В своей работе [26] они приводят регрессионные уравнения только для микроводорослей рода *Ceratium*. Величины полученных объемов отличаются от объемов метода подобных фигур не более чем на 20%.

- **Использование трехмерных (3D) компьютерных моделей.** Муханов В.С. и Лях А.М. [27] предложили восстанавливать форму микроводоросли не из набора простых геометрических тел, а при помощи компьютерного 3D моделирования. В первую очередь создаются т.н. "базовые модели" клеток фитопланктона, являющиеся моделью микроводоросли со среднестатистическими размерами. Затем "базовая модель" деформируется, до соответствия ее размеров размерам исследуемой клетки. После чего некоторым частям деформированной модели ставятся в соответствие трехмерные модели текстуры, которые отражают рельефность поверхности живой микроводоросли. Объем исследуемой клетки рассчитывается как сумма объема 3D модели и объемов соответствующих текстурных элементов. Величины данных объемов отличаются от объемов метода подобных фигур на 50% и более.

- **Автоматизированные методы** могут использоваться как для определения численности, так и для вычисления биомассы микроводорослей. К автоматизированным методам относятся: метод проточной цитофлуориметрии (flow cytometry) [28]; подсчет численности и объема клеток фитопланктона с помощью счетчика Коултера (Coulter Counter); применение цифровой обработки изображений для определения количества и объема клеток. Величины биомассы, вычисленные автоматизированными методами, отличаются от значений объемов, полученных непосредственными измерениями. Например, коэффициент перехода от объемов, расчетанных в счетчике Коултера, к "истинным" объемам клеток изменяется от 1.24 до 2.04 [9]. Объем микроводоросли, вычисленный при цифровой обработке изображения, определяется с использованием величиной периметра изображения клетки, и некоторых предположений о форме клетки, которые не всегда верно эту форму описывают [29]. В то же время численность, рассчитанная автоматически, наиболее точно отражает реальные количественные отношения в фитопланктонном сообществе.

Обобщая методы вычисления биомассы, можно сделать следующие выводы:

1. Первые три метода определения биомассы, которые наиболее часто применяют при исследованиях фитопланктона Черного моря, дают сопоставимые значения биомассы.

Таблица. Методы количественного учета фитопланктона и их погрешности.

Метод	Погрешность
Отбор пробы сетью	Численность микроводорослей в 1,3 раза меньше чем при отборе пробы батометром [4]
Фиксирование пробы 2% раствором Люголя	Объем клеток уменьшается в 1,33 раза [9]
Осадочный метод	Погрешность 32-36%, в среднем 34% [7;11]
Осадочный метод; проба фиксирована формалином; исследователь приводит данные по синезеленым водорослям или по суммарному фитопланктону.	Результаты не достоверны [5]
Метод центрифугирования	Погрешность 30% [5]
Метод центрифугирования; исследователь приводит данные по мелким жгутиковым водорослям; центрифугирование длилось более 5 мин., или частота оборотов была выше 2000 об/мин.	Результаты не достоверны [5]
Метод фильтрации; фильтр не был исследован.	Результаты не достоверны [13]
Метод фильтрации; применялись нуклеопорные фильтры с диаметром пор 0,5 мкм и 1 мкм.	Погрешность 20%, коэффициент пересчета 1,25 [6;15]
Комбинированный метод	Погрешность 15% [7]
Метод обратной фильтрации	Погрешность 20-25%, коэффициент пересчета 1,27 [12]
Подсчет крупных микроводорослей (размером более 50 мкм) в камерах Наумана и Нажокта.	Результаты не достоверны [4;18]
Объем исследуемой подпробы менее 100 мл	Результаты не достоверны [19;20]
Величины биомассы вычисленные автоматическими и расчетными методами.	Результаты несопоставимы.

2. Метод 3D моделирования находится в стадии разработки, поэтому пока не имеет практического применения. Однако, на наш взгляд, является одним из перспективных методов.
3. Величины биомассы, вычисленные автоматизированными методами, не сопоставимы с величинами биомассы первых трех методов.

Заключение

Рассмотренные в работе методы и их погрешности приведены в таблице. Формулировка "результаты недостоверны", характеризует степень сопоставимости массивов данных, и используется как критерий их пригодности для включения в общую БД. Приведенные погрешности не следует рассматривать как абсолютно точные значения, они варьируют в некоторых пределах и, прежде всего, зависят от качества работы исследователя. Данные погрешности будут использоваться при пересчете массивов данных для их последующего сопоставления. Достоверность выводов должна определяться задачами исследования и знанием степени соответствия используемых методов для решения этих задач. В дальнейшем будут разработаны более четкие критерии оценки достоверности данных, и предложены рекомендации по применимости массивов БД.

ЛИТЕРАТУРА

1. Еремеев В.Н., Суворов А.М., Халиуллин А.Х., Годин Е.А. Комплексный цифровой атлас справочник Азово-Черноморского бассейна // Системы контроля окружающей среды.- Севастополь, МГИ.-1998.-С.118-121.
2. Роухийнен М.И., Георгиева Л.В., Сеничкина Л.Г. О сравнительной уловистости фитопланктона сетью и батометром // Исследования центрально - американских морей.- К.:Наук.думка,1971.- Вып.3.- С.50-63.
3. Стельмах Л.В. Вклад пикопланктона в первичную продукцию и содержание хлорофилла а в эвтрофных водах на примере Севастопольской бухты // Океанология.-1988.- Т.28.-№1.-С.127-132.
4. Барабашева Ю.М., Кольцова Т.И., Полякова Т.В. Статистическая проверка количественного анализа батометрических и сетевых проб фитопланктона // Гидробiol. журнал.- 1989.- Т.25.- №5.- С.80-83.
5. Михеева Т.М. Методы количественного учета нанофитопланктона (обзор) // Гидробiol. журнал.-1989.-Т.25.- №4.- С.3-21.
6. Современные методы количественной оценки распределения морского планктона.- М.:Наука.-1985.-280 с.
7. Федоров В.Д. О методах изучения фитопланктона и его активности. - М.: Изд. Моск. Унив-та,1979. -168 с.
8. Киселев И.А. Планктон морей и континентальных водоемов.-Л.:Наука.-1969.- Т.1.-660с.
9. Montagnes D.J.S., Berges J.A., Harrison A.J., Taylor F.J.R. Estimating carbon, nitrogen, protein, and chlorophyll a from volume in marine phytoplankton // Limnol. Oceanogr.- 1994.- V.39. - №5.- P.1044-1060.
10. Усачев П.И. Количественная методика сбора и обработки планктона // Тр. ВГБО.- 1961.-Т.11.-С.411-415.
11. Суханова И.Н., Ратькова Т.М. Сравнение численности фитопланктона в пробах, собранных методом двойной фильтрации и стандартным методом осаждения // Океанология.- 1977.- Т.17.- Вып.4.- С.691-693.
12. Сорокин Ю.И. К методике концентрирования фитопланктона // Гидробiol. журнал.-1979.- Т.15.- №2.- С.71-76.
13. Михеева Т.М. К учету фитопланктона непосредственно на мембранных фильтрах // Гидробiol. журнал.- 1973.- Т.9.- №6.- С.114-119.
14. Ведерников В.И., Суханова И.Н. К методике определения численности фитопланктона с использованием ядерных фильтров // Океанология.- 1979.- Т.19.- Вып.4.- С.742-748.
15. Ведерников В.И., Микаэлян А.С. Количественный учет морского фитопланктона с использованием ядерных фильтров // Океанология.- 1981.- Т.21.- Вып.5.- С.927-933.
16. Thomas W.H., Dodson A.N. Concentrating plankton in a gentle fashion // Limnol. Oceanogr.- 1964.- V.9.- №3.- P.455-456.
17. Hötsel G., Croome R. A phytoplankton methods manual for Australian freshwaters.- Canberra,LWRRDC. - 1999. - 45p. - (www.lwrrdc.gov.ua).
18. Беляева Т.В. Определение и счет диатомей в камерах и постоянных препаратах // Океанология.- 1977.- Т.17.- Вып.4.- С.741-749.
19. Кольцова Т.И., Конопля Л.А., Максимов В.Н., Федоров В.Д. К вопросу о представительности выборок при анализе фитопланктонных проб // Гидробiol. журнал.-1971.- Т.7.- №3.
20. Кольцова Т.И., Лихачева Н.Е., Федоров В.Д. О количественной обработке проб фитопланктона. I. Сравнение объемов выборок при исследовании различных структурных характеристик морского фитопланктона // Биологические науки.-1979.- №6.- С.96-100.

21. Оксюк О.П., Юрченко В.В. К методике определения биомассы фитопланктона // Гидробиол. журнал.- 1969.- Т.5.-№6.
22. Сеничкина Л.Г. К методике вычисления объемов клеток планктонных водорослей // Гидробиол. журнал.- 1978.- Т.24.- №5. - С.102-103.
23. Макарова И.В., Пичкилы Л.О. К некоторым вопросам методики вычисления биомассы фитопланктона // Ботан. журн. - 1970. - Т.55. - №10. - С.1488-1494.
24. Брянцева Ю.В. Изменчивость структурных характеристик фитопланктона в Черном море. Автореф. Дис. ... канд. Biol. Наук. - Севастополь:ЕКОСИ-Гидрофизика.- 2000.- 18с.
25. Сеничкина Л.Г. Вычисление объемов клеток диатомовых водорослей с использованием коэффициентов объемной полноты // Гидробиол. журн.- 1986.- Т.22.- №1.- С.56-59.
26. Суханова И.Н., Цейтлин В.Б. Оценка объемов клеток рода *Ceratium* // Океанология.- 1993.-Т.33.-№4.-С.623-626.
27. Lyakh A.M., Mukhanov V.S., Kemp R.B. The virtual cell project for the investigation of microalgal morphology and dispersity of natural phytoplankton // 17th European Workshop on Computational Geometry (CG'2001). Progr.&Abstr. March 26th-28th. 2001. Inst. of Computer Sci., Freie Universität Berlin.-2001.-P. 57-58.
28. Юнев О.А., Салдан Н.В., Финенко З.З., Зенин В.В., Бабич И.И. Анализ черноморского фитопланктона методом проточной цитофлуориметрии // Океанология.-1990.- Т.30.- Вып.3.- С.515-521.
29. Project ADIAC: Automatic Diatom Identification And Classification.- University of Algarve, Portugal. - <http://www.ualg.pt/adiac/>