

УДК 574.5:591.524.12.08

Оценка количества мертвых особей рачкового зоопланктона в водоеме с помощью окрашивания проб анилиновым голубым: методические аспекты применения

Ольга П. Дубовская*

Институт биофизики Сибирского отделения
Российской академии наук,
Академгородок, Красноярск, 660036 Россия¹

Received 2.06.2008, received in revised form 25.08.2008, accepted 27.08.2008

Для проверки предположения, что по мере переработки тканей мертвой особи микроорганизмами-гетеротрофами интенсивность окрашивания трупов планктонных ракообразных анилиновым голубым уменьшается, провели три длительных эксперимента по определению скорости разложения трупов и изменению окраски по мере их разложения с убитыми нагреванием копеподами циклопов (*Cyclops vicinus*, *Mesocyclops leuckarti*, эксперименты 1, 2), циклопами и дафниями разного размера и стадий (*C. vicinus*, *Daphnia* группы *longispina*, эксперимент 3). Кроме того, была проведена методическая работа по окрашиванию живых рачков, только что травмированных механически, для имитации возможных механических повреждений зоопланктеров при отборе проб и выявления характера их окрашивания. Эксперименты показали, что чем сильнее заселен труп микроргетеротрофами, тем менее интенсивно он окрашивается. В зависимости от температуры окружающей воды и морфологических особенностей кладоцер и копепод (открытые створки и относительно тонкая кутикула у дафний, более прочный и замкнутый панцирь у циклопов) «возраст» трупа рачка, когда он перестает окрашиваться из-за сильной переработки своих тканей микроргетеротрофами, определяется как 1-4 суток от момента гибели. Напротив, полностью и интенсивно окрашивается мертвая особь, умершая в интервале 1 час – 1-3 суток до отбора и окрашивания пробы. Механически травмированные живые особи окрашиваются не полностью: либо только по месту травмы, либо больше, но обычно не более 1/2 или 2/3 всего тела. Для повышения точности учета мертвых особей в пробах из водоема с использованием метода окраски анилиновым голубым даны соответствующие методические рекомендации.

Ключевые слова: краситель анилиновый голубой, живой и мертвый зоопланктон, *Daphnia*, *Cyclops vicinus*, скорость разложения.

Введение

Организмы в водных экосистемах, как и везде в природе, умирают постоянно. Смерть организма может наступить либо вследствие потребления его организмами высших трофи-

ческих уровней, либо «естественно» (Wetzel, 1995): в результате физиологического старения, неблагоприятных физических и химических факторов (Velimirov, 1991), кроме того, голодания (недостатка как количества, так

* Corresponding author E-mail address: dubovskaya@ibp.krasn.ru

¹ © Siberian Federal University. All rights reserved

и качества пищи), повреждения при неудачных атаках хищников, болезней и паразитов (Gries and Gude, 1999). Во всех случаях “естественной” смерти особи в среде ее обитания в водоеме появляется ее труп. Поэтому количество трупов (или мертвых особей) является мерой “естественной” или “не связанной с потреблением хищниками” смертности и в целом качества среды, условий функционирования исследуемых популяций и предпосылкой прогноза динамики сообщества. По доле (проценту) мертвых особей судят о динамике или (и) величине естественной смертности и факторах, ее определяющих (например, Зелезинская, 1966; Коваль, 1984; Дубовская, 2005; Павлова и Мельникова, 2005; Tang et al., 2006; Дубовская и др., 2007).

На основе учета мертвых особей и изменения скорости их осадения с помощью седиментационной ловушки предложен прямой метод определения удельной не связанной с хищниками смертности в популяциях рачкового зоопланктона пелагиали пресноводного водоема (Гладышев и Губанов, 1996; Дубовская и др., 1999; Gladyshev et al., 2003; Dubovskaya et al., 2003):

$$m_i = \frac{y_{i+1} - y_i}{\Delta t_i \cdot N_i} + G \cdot \frac{y_i}{N_i} \quad (1),$$

где G – удельная скорость элиминации трупов, сут⁻¹; t_i – момент взятия i -й пробы, $\Delta t_i = t_{i+1} - t_i$, сут; y_i и N_i – численности мертвых и живых особей в i -й пробе, экз·м⁻³; m_i – удельная смертность, сут⁻¹, в момент времени t_i . Для определения G принимается, что основная составляющая элиминации трупов рачков из пелагиали – осадение, а другими составляющими – разложением и потреблением детритофагами – можно пренебречь, так как трупы осаждаются из эпилимниона пелагиали прежде, чем разлагаются и поедаются детрито-

фагами. Скорость осадения трупов v , м·сут⁻¹, определяется как

$$v = Y/(S \cdot y^*) \quad (2),$$

где Y – накопленное за сутки количество мертвых особей в цилиндре седиментационной ловушки, экз·сут⁻¹; S – площадь входного отверстия цилиндра, м²; y^* – численность мертвых особей на горизонте экспонирования ловушки (расположенного ниже слоя отбора проб), экз·м⁻³. Удельная скорость элиминации G рассчитывается по формуле

$$G = v/h \quad (3),$$

где h – глубина слоя отбора проб. Для получения надежных значений y^* пробы зоопланктона отбирают несколько раз за время экспозиции ловушки (ловушек), равное одним суткам. Для уменьшения ошибки метода прямого определения естественной смертности следует в периоды низкой численности брать пробы большего объема, достаточного для надежного подсчета численности не только живых, но и мертвых особей, чтобы избежать артефактов, связанных с низкой численностью. При определении скорости осадения мертвых особей с помощью ловушек следует увеличивать площадь захвата оседающих трупов путем экспонирования не одной, а двух-трех ловушек одного типа.

Как видно из уравнения (1), доля мертвых особей как отношение численности мертвых к численности живых является его составной частью и тесно коррелирует ($r = 0.76-0.99$ для *Daphnia*, Дубовская, 2005) с определяемой по этому уравнению величиной не связанной с хищниками смертности. Так что доля мертвых особей может быть использована как индикатор (показатель) естественной смертности там, где ее расчет невозможен, в частности, при кратковременном мониторинге больших акваторий (например, Телеш, 1986; Дубов-

ская, 1987; Ряпенко и Полюнов, 1991; Гладышев, 1993; Смелльская, 1995; Дубовская и др., 2007).

Для дифференциации организмов в пробах зоопланктона на живых – бывших живыми в водоеме и погибших в результате добавления фиксатора в пробу, и мертвых – погибших в водоеме до отбора пробы, используются различные методы. В частности, визуальная оценка состояния мускулатуры особей из обычной фиксированной пробы (Коваль, 1984; Гептнер и др., 1990; Павлова и Мельникова, 2005) или из фиксированной пробы, окрашенной эритрозином (Кастальская-Карзинкина, 1935; 1937; Зелезинская, 1966); визуальная оценка количества окрашенных и неокрашенных особей в пробах, подвергшихся перед фиксацией окрашиванию красителями: проционовым красным (Ряпенко и Полюнов, 1991; Наумова, 2006), нейтральным красным (Fleming and Coughlan, 1978; Лебедева и др., 1982; Tang et al., 2006), анилиновым голубым водорастворимым (Seepersad and Crippen, 1978; Телеш, 1986; Дубовская, 1987; Сергеева и др., 1989; Гладышев, 1993; Смелльская, 1995; Гладышев и Губанов, 1996; Дубовская и др., 1999; Gladyshev et al., 2003; Dubovskaya et al., 2003; Дубовская и др., 2004; Дубовская, 2005; Дубовская и др., 2007). Нейтральный красный окрашивает живых особей, проционовый красный и анилиновый голубой – мертвых. Приведенные выше примеры применения нейтрального красного относятся к морскому и эстуарному зоопланктону, двух других красителей – к пресноводному зоопланктону различных водоемов.

Первые наши проверки чувствительности методики окрашивания анилиновым голубым (Дубовская, 1987) показали совпадение с результатами авторов (Seepersad and Crippen, 1978): только что погибшие особи совсем не окрашиваются или окрашиваются частично, а полностью окрашиваются трупы рачков, по-

гибших минимум за час до окраски и раньше. Однако чем дольше находится труп в воде, тем сильнее разлагаются его ткани в результате деятельности микроорганизмов-гетеротрофов, и тогда полнота и интенсивность его окраски может изменяться. То есть трупы, умершие в разное время до момента отбора пробы, могут существенно различаться по окраске. Возникает важный для минимизации ошибки дифференциации живых и мертвых особей вопрос: как изменяется окраска трупа по мере его разложения или как окрашиваются трупы разного «возраста»?

В процессе отбора любой пробы зоопланктона некоторые особи могут механически травмироваться – получить разрывы покровов, потерять части тела, способность к передвижению. Несмотря на то, что мертвые особи начинают окрашиваться не сразу после гибели, живые, но травмированные особи могут в той или иной степени окрашиваться за счет проникновения краски в разрывы покровов. Поэтому при использовании любого красителя для окраски живой пробы зоопланктона возникает важный для уменьшения ошибки подсчета числа мертвых особей вопрос: как окрашиваются живые, но травмированные особи, с разрывами покровов и без видимых разрывов, но обездвиженные? Цель настоящей работы – ответить на поставленные вопросы и дать соответствующие методические рекомендации в случае применения красителя анилинового голубого по известной методике Сиперсада и Криппена (Seepersad and Crippen, 1978).

Материалы и методы

Руководствуясь предложениями разработчиков методики использования красителя анилинового голубого для разделения живого и мертвого зоопланктона (Seepersad and Crippen, 1978), мы всегда используем: концентрацию раствора красителя – 7.5 г/100 мл

дистиллированной воды; время окрашивания пробы – 15 мин; фиксацию промытой пробы – в 10 %-ном формалине; хранение фиксированных проб до обработки – в холодильнике при 4-15 °С. Краситель «анилиновый голубой водорастворимый» (С.І. 42780, $C_{37}H_{27}N_3Na_2O_9S_3$, М.м. 799.8) имеет много иных названий (Фрайштат, 1980, с.42). Мы опробовали и используем в настоящее время краситель, выпускаемый как «Methyl blue» (SIGMA, USA, St.Louis и SIGMA, Germany, Steinheim).

Для окраски проб разработано специальное устройство («стейнер», рис.1), позволяющее окрашивать одновременно четыре пробы зоопланктона прямо на борту лодки или судна сразу же после отбора проб (Гладышев, 1993). Раствор красителя используется многократно. Весь процесс окрашивания выглядит следующим образом. Только что отобранную пробу (пробы) зоопланктона из стаканчика планктонной сети аккуратно сливают в стаканчик с дном из капронового мелкого сита, закрывают его крышкой также из мельничного сита, помещают его в специальное основание в стейнере, в который заливают через воронку раствор красителя. При этом нажимают на кнопку на крышке стейнера, приводящую в положение «нажатие» на крышку и дно стаканчика систему рычагов, способствующих выходу воздуха из стаканчиков и полному заполнению их красящим раствором. Последующее частое отпускание и нажатие кнопки в течение первых минут окрашивания пробы обеспечивает полное заполнение объема стаканчика красителем и избегание скоплений в нем пузырьков воздуха, в которых могут оказаться неокрашенные трупы зоопланктеров. Сливается краситель через нижний кран, при этом для удаления красителя из стаканчика следует опять произвести несколько нажатий на кнопку. Стаканчик вынимают из стейнера, промывают заборной (или водопроводной)

водой до полного удаления красителя. Промывать следует аккуратно, амплитуда движений стаканчика в воде или интенсивность промывающей струи должна быть слабой во избежание дополнительного травмирования находящихся в стаканчике зоопланктеров. Далее их смывают профильтрованной через мельничное сито водой из водоема или водопроводной водой в емкость, где хранится проба, добавляют концентрированный формалин из расчета его концентрации в пробе 10 %. При работе на водоеме следует предохранять раствор краски от перегрева на солнце, температуры краски и промывающей воды должны быть близки к природной для данной пробы зоопланктона.

Для решения первого вопроса были проведены три эксперимента по определению скорости разложения трупов и изменения окраски по мере их разложения. Первые два эксперимента включали только копепоидов циклопов (*Cyclops vicinus*, *Mesocyclops leuckarti*) размером 0.6-0.8 мм, третий – циклопов (*Cyclops vicinus*) и дафний (*Daphnia* группы *longispina*) разного размера и стадий. Схема проведения была следующая. Порцию сгущенной сетной пробы живого зоопланктона из водоема помещали в камеру Богорова, под бинокляром глазной пипеткой отлавливали живых активных рачков, рассаживали по 12-14 особей в 5-7 стаканчиков. В стаканчиках находилась вода из водоема, профильтрованная через предварительно прокипяченный фильтр «Сынпор» № 3 (в экспериментах 1 и 2) или через мелкое (размер пор – 0.07мм) мельничное сито (в эксперименте 3). Рачков убивали нагреванием до 45-55 °С. Через 1.5-3 часа после гибели рачков содержимое стаканчика №1 окрашивали анилиновым голубым. Остальные стаканчики помещали в стеклянный цилиндрический аквариум, который устанавливали у окна, на естественный свет. Чтобы сгладить резкие колебания в течение суток температуры воздуха,



Рис. 1. Устройство для окрашивания проб зоопланктона для дифференциации на живых и мертвых особей по (Гладышев, 1973)

в аквариум наливали воды до уровня 1/2 высоты стаканчиков, стоящих на дне аквариума. Далее через каждые 2-3 суток (в экспериментах 1, 2) или 1 сутки (в эксперименте 3) снимали по одному стаканчику: содержимое стаканчика просматривали под биноклем, затем окрашивали, фиксировали, просматривали сразу же или на следующий день и еще раз через несколько (3-7) суток. При каждом просмотре отмечали состояние и окраску каждого трупа, некоторых фотографировали с помощью цифрового фотоаппарата Nikon Coolpix 4500, насаженного на окуляр биноклярного микроскопа МБС-10. Отдельные трупы после окрашивания просматривали под флуоресцентным микроскопом Axioskop 40 (Carl Zeiss) и фотографировали камерой "MC-3254R/MFG 3ccd color video camera" (AVT-Horn, Aalen, Germany) с использованием программного обеспечения AxioVision 3.1. Температуру в аквариуме со стаканчиками измеряли 1-3 раза в течение суток. В экспериментах 1 и 2 мертвых рачков окрашивали красителем «Methyl blue» (производства SIGMA, USA, St.Louis) после многократного использования, в эксперименте 3 – свежеразведенным (производства SIGMA, Germany, Steinheim).

Для ответа на вопрос о характере окрашивания травмированных особей проведена следующая серия экспериментов. Нефиксированные пробы сетного зоопланктона из водоема и из различных лабораторных культур просматривали под биноклем в камере Богорова, отлавливали глазной пипеткой активных, без видимых повреждений, разноразмерных особей дафний (*Daphnia* группы *longispina*) и самок, самцов, копеподитов циклопов (*Cyclops vicinus*, *Mesocyclops leuckarti*), поочередно помещали в капле воды на предметное стекло, травмировали тонкой иглой. В результате ударов иглой получались: локальные разрывы карапакса, вмятины карапакса и повреждения

внутренних органов, часто сопровождаемые обездвиживанием рачков. Поврежденных, но живых рачков с сокращающимся сердцем (дафнии) или кишечником (циклопы) и в той или иной мере работающими головными и грудными конечностями (дафнии и циклопы) помещали в стаканчик с водой. Когда в стаканчике оказывалось около 10 особей, эту пробу травмированного зоопланктона подвергали окраске в стейнере. От момента травмирования до начала окрашивания проходило 15-40 мин. После осторожного промывания (в водопроводной воде) пробу просматривали под биноклем, отмечали характер окраски особей и их состояние. Затем пробу фиксировали, просматривали повторно по той же схеме, что и в экспериментах по скорости разложения мертвых рачков. Было проведено несколько таких экспериментов в разные годы и сезоны с использованием красителя «Methyl blue», как свежеразведенного (производства SIGMA, Germany, Steinheim), так и многократно использованного (производства SIGMA, USA, St.Louis).

Результаты и их обсуждение

Амплитуда колебаний температуры составляла: за период 1-го эксперимента – 21-26 °С, за период 2-го – 15-18 °С, 3-го – 16-19 °С. В стаканчиках развивались различные микроорганизмы, из которых простейших было легко наблюдать при просмотре содержимого стаканчика под биноклем. В первом стаканчике все рачки были равномерно или почти равномерно окрашены (например, рис. 2) – синие или темно-синие (обычно темнее при использовании свежеразведенного красителя по сравнению с многократно использованным, приготовленным давно). Ткани рачков, утратившие «четвертичную» структуру органического вещества живого организма, легко окрашивались. Следует отметить, что

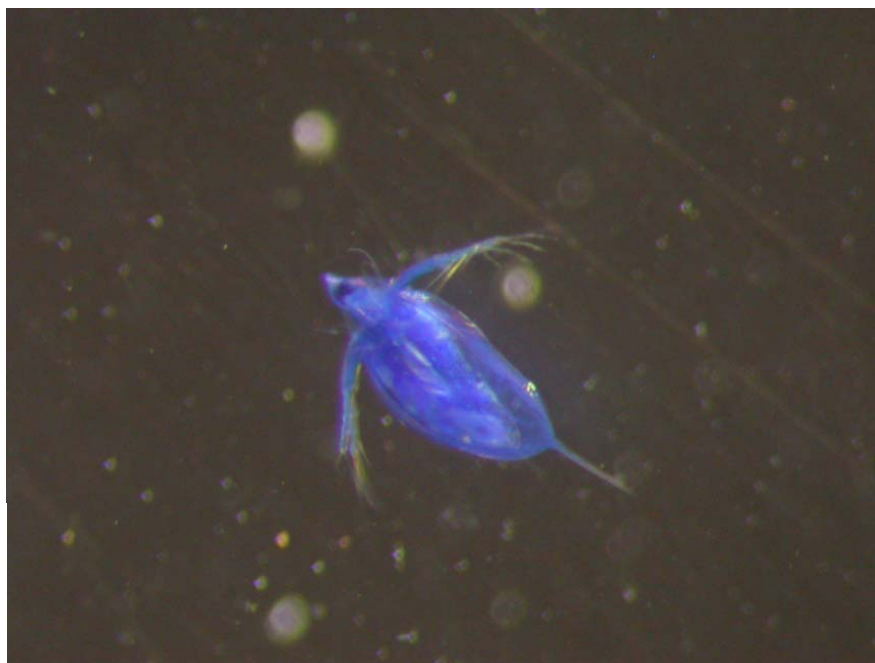


Рис. 2. Окрашенная особь дафнии, умершая примерно за 1 час до окрашивания пробы. Здесь и далее дафнии – *Daphnia* группы *longispina*, циклопы – половозрелые и копепоиды *Cyclops vicinus*

окрашиваются внутренние ткани рачков, а экзувии, экзоскелеты (панцири) циклопов и копепоидов практически не окрашиваются (в многократно использованной краске) или окрашиваются очень слабо, приобретая голубоватый-синеватый оттенок (в свежеразведенной краске). То есть краситель слабо взаимодействует с хитиновым покровом тела, но сильно – с мягкими, внутренними мертвыми тканями рачков.

В экспериментах с течением времени ткани мертвых рачков заселялись, потреблялись, перерабатывались различными микроорганизмами-гетеротрофами, потребителями мертвого органического вещества – простейшими, бактериями и грибами (например, рис. 3 а, б, в). Довольно скоро внутреннее содержимое рачка становилось рыхлым, комковатым, с вкраплениями шариковидных простейших, белого цвета, иногда были видны гифоподобные клубки, комки, части которых порой выходили наружу через разрывы по-

кровов. Прозрачные концевые части панциря внутри могли быть пустыми (см. также рис. 2, 4, 6 в работе Танга с соавторами (Tang et al., 2006)). Покровы теряли четкие очертания, обрастая бактериями и грибами, становились «мохнатыми, опушенными», мягкими, но сохранялись довольно долго. Мертвые рачки, ткани которых были переработаны и панцирь заполнен микроорганизмами-гетеротрофами, не окрашивались или окрашивались очень слабо, приобретая лишь голубоватый или синеватый оттенок (рис. 4 а, б, в, см. также рис. 3 б, в). В конце концов от рачка оставались рыхлые облепленные микроорганизмами куски или части пустого панциря, которые после окраски пробы идентифицировать как останки конкретного рачка было очень трудно, практически невозможно. Явного всплывания разлагающихся трупов – «антидождь трупов» (Зелезинская, 1966) – не наблюдали.

В первом эксперименте при довольно высокой температуре воды (24-26 °С) стадия



а



б



в

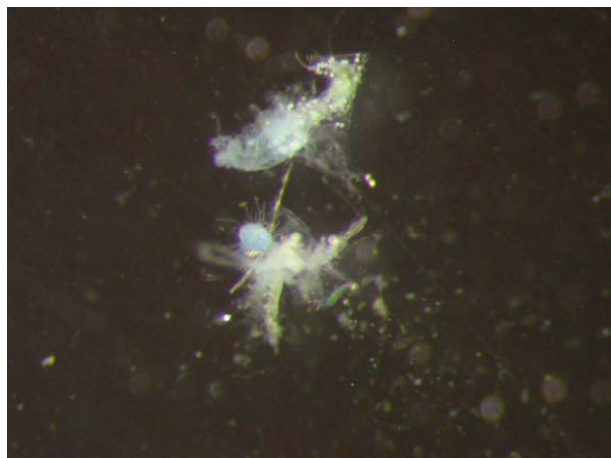
Рис. 3. Заселение трупов дафнии (а) и циклопов (б, в) микрогетеротрофами (в основном, инфузориями) на разных стадиях разложения и, соответственно, «возраста» трупа до окрашивания: дафнии (а) – около 1 суток, циклопов (б, в) – около 3-4 суток, здесь и далее температура воды 19-16 °С



а



б



в

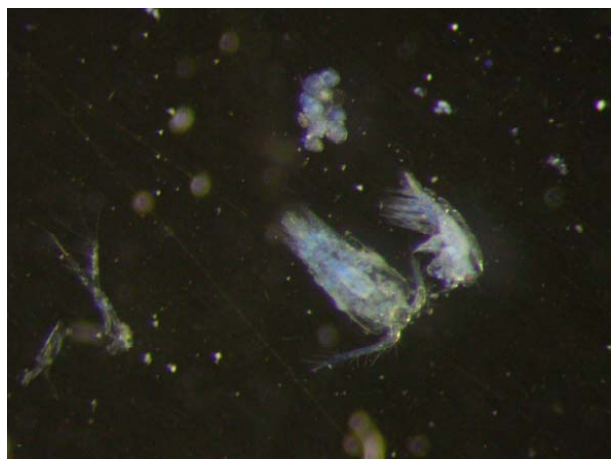
Рис. 4. Трупы рачков, которые уже фактически не окрашиваются при стандартной окраске пробы:
а – копепоидит циклопа, умерший более 3 суток назад, б – копепоидит, умерший 6 суток назад, в – останки дафний, умерших 3 суток назад

разложения мертвого копепода, когда еще сохраняются довольно четкие его покровы (панцирь), но уже он заполнен живыми гетеротрофами и не окрашивается, была достигнута за трое суток (с 7 по 10.08), при снятии стаканчика № 2. Невозможность после окрашивания идентификации кусков детрита как останков именно копеподов была зафиксирована через 10 суток (20.08) при снятии последнего стаканчика, а за 4 суток до этого (16.08) трупы копеподов еще можно было узнать. Во втором эксперименте через двое суток после его начала (с 26 по 28.09) мертвые копеподы еще окрашивались (в стаканчике № 2), а через 6 суток (2.10, стакан № 3) – уже не окрашивались. У половины трупов копеподов из этого стаканчика покровы панциря были еще четкими, но у другой половины – рыхлыми, «опушенными», размягченными. Температура воды в этот период была значительно ниже, чем в эксперименте 1, и изменялась в пределах 15.4–18.2 °С. Стадия разложения, когда панцирь рачка выглядел снаружи «мохнатым, опушенным», а внутри частично был пуст, частично заполнен белым рыхлым содержимым, и в котором с большим трудом можно было узнать труп копепода, продолжалась довольно долго, пока через 17 суток (19.10) в последний стаканчик (его содержимое периодически просматривалось под биноклем без окрашивания) не добавили воды из водоема, дважды процеженной через мелкий мельничный газ. Через неделю (26.10) в содержимом стаканчика после окрашивания остались беловатые куски детрита с отдельными фрагментами пустого панциря.

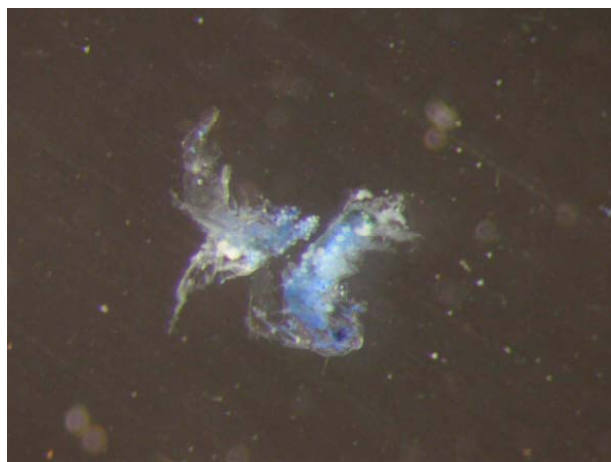
В третьем эксперименте при использовании свежеразведенной краски через сутки после начала (с 14 по 15.08, стакан № 2) почти все мертвые рачки были полностью и интенсивно окрашены (как на рис. 2), за исключением двух дафний из шести и одного копепода из

пяти, которые выглядели наиболее заселенными микрогетеротрофами и менее интенсивно окрашенными. Через двое суток после начала (16.08, стакан № 3) соотношение окрашенных и слабоокрашенных, но сильно заселенных трупов рачков изменилось: из шести дафний пять и из пяти циклопов два были слабо или частично окрашенными с белыми или синими точками простейших и других микрогетеротрофов внутри трупа (рис. 5 а, б). Через трое суток (17.08, стакан №4) все трупы дафний и четыре из шести – циклопа были неокрашенными или очень слабо, частично окрашенными, сильно пререработанными микрогетеротрофами (см. рис. 4 в). Температура воды в течение этих трех суток изменялась в пределах 19–17.5 °С. Еще через трое суток (20.08, в стакане №5, при снижении температуры воды до 16.5 °С) все трупы были сильно переработаны, особенно туловище дафний, и все они практически не окрашивались (см. рис. 4 б); у некоторых останков после окрашивания появлялся голубоватый оттенок. После процедуры окрашивания от большинства дафний остались наиболее узнаваемыми частями тела головы с глазом (но без панциря), от циклопов – головогрудь (панцирь). Панцири были частично заполнены живыми гетеротрофами, а концевые отделы были пустыми.

Трупы дафний по сравнению с трупами циклопов в каждом стаканчике визуально выглядели более разложившимися, более переработанными, а после окраски проб они раньше переставали окрашиваться или окрашивались менее интенсивно. Из этого следует, что дафнии разлагались быстрее, чем циклопы, т.е. период разложения дафний несколько короче (примерно на сутки), чем циклопов. По-видимому, это связано с особенностями их морфологии: тело дафний более открыто для заселения микрогетеротрофами, чем покрытое плотной кутикулой тело циклопа, а сама



а



б

Рис. 5. Трупы копеподитов циклопов (а) и дафнии (б) двухсуточного «возраста» (при 19-17.5 °С) после стандартной процедуры окрашивания

кутикула карапакса дафнии выглядит тоньше и нежнее, чем циклопа. Полагаем, что при относительно слабом нагревании (до 45-50 °С) стаканчиков с рачками в эксперименте 3 разные особи дафний и циклопов оказывались по-разному поврежденными (одни – более, другие – менее), в связи с чем степень разложения разных особей одного вида в одном стаканчике несколько варьировала и часть трупов была менее заселенная и в большей степени окрашивалась, а другая часть была более заселенной, более переработанной и не окрашивалась.

Интересно, что при разложении трупов дафний их глаз оставался долгое время

(вплоть до конца разложения) целостным или слабо мацерированным. Между тем в планктонных пробах встречаются особи (обычно полуокрашенные или неокрашенные) клadoцер с нарушенным глазом. По-видимому, это травмированные при отборе проб особи с «раздавленным» глазом. Яйца в выводковой камере окрашенных трупов дафний суточного возраста (в стакане № 2) оказались неокрашенными, совершенно целыми на вид. Позднее (через трое суток, в стакане № 4) обросшие гетеротрофами яйца дафний оказывались слабо окрашенными, голубыми или голубоватыми (см. рис. 4 в). По-видимому, они разлагались медленнее, чем само тело дафнии.

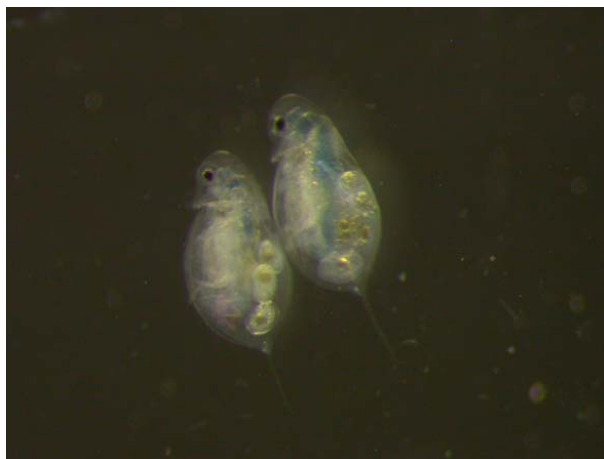
Танг с соавторами (Tang et al., 2006), работающий с красителем «нейтральный красный», окрашивающим живых копепод и не окрашивающим мертвых, считал этот краситель удобнее, чем окрашивающий мертвых особей анилиновый голубой, в связи с предположением, что по мере разложения и потери собственных тканей способность трупa удерживать краситель (окрашиваться) может уменьшаться. Наши эксперименты показали, что это действительно так, но интенсивность окрашивания довольно четко различается по «возрастам» мертвой особи, и чем менее она окрашена, тем явственнее в ней признаки разложения и разрушения, видимые под биноклем при обработке пробы и позволяющие отнести данную особь к мертвым, умершим в водоеме за несколько суток до отбора пробы.

В целом наши данные по времени и характеру разложения мертвых копеподитов близки к приводимым Л.М. Зелезинской (1966), В.Н. Степановым, Л.С. Светличным (1981), Тангом с соавторами (Tang et al., 2006) для копепод. По данным последних авторов, разложение копепод *Acartia tonsa* при 20 °C завершается (до стадии почти пустого карапакса) за 150 часов, а при 30 °C – за 100 часов, при средней температуре поверхностной воды в районе отбора проб 27.5 °C за период разложения акартии принято 4 суток. В наших экспериментах мертвые ткани циклопов под кутикулой превращались в живой сгусток микроорганизмов-гетеротрофов и переставали окрашиваться при температуре воды 24-26 °C за 2-3 суток, а при температуре, близкой к 16-17 °C, – за 3-4 суток (>3, но < 6 в экспериментах 2, 3). Для дафний этот период несколько короче и составляет 1-3 суток. Таким образом, по данным наших экспериментов, «возраст» трупa рачка, когда он перестает окрашиваться из-за сильного заселения живыми гетеротрофами и сильной переработки собственных

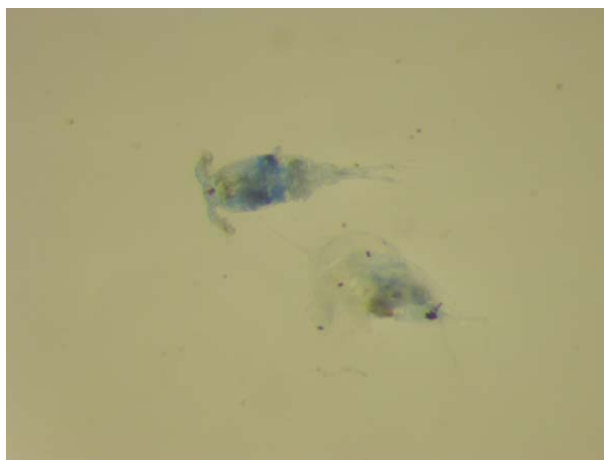
тканей, в связи с температурой окружающей воды и особенностями морфологии тела кладоцер и копепод, определяется как 1-4 суток от момента гибели.

Если в пробах из водоема учитывать мертвых только по окраске, возможен недоучет таких «старых» трупов. Недоучет трупов в водоеме, в частности на горизонте экспонирования седиментационной ловушки, приводит к возрастанию величины скорости осаждения трупов (см. формулу 2). Однако их легко дифференцировать как мертвых и без окрашивания по внешним вышеописанным признакам. В экспериментах собственно кутикула разрушалась медленно, останки копеподитов превратились в отдельные куски детрита не ранее чем через 10 суток. Полагаем, что в водоеме, в нефильтованной воде, где больше различных гетеротрофов, детритофагов (не только микро-, но и мезо-, макроорганизмов), а водные массы подвижны, полное разрушение и исчезновение (элиминация) трупов происходит гораздо быстрее. Неокрашенные рачки явно неживого вида встречаются в пробах из водоема крайне редко. После проведенных экспериментов ясно, что это особи, умершие 1-4 суток тому назад. Сравнение скоростей разложения мертвых рачков (несколько суток) со скоростями их осаждения (в среднем 1-4 м/сут (Bloesch and Burns, 1980); 0.4-5.8 м/сут (Дубовская, 2006) показывает, что мертвые в основном покидают перемешиваемый слой пелагиали быстрее, чем разлагаются, т.е. осаждение действительно основная составляющая элиминации мертвых из эпилимниона пелагиали пресноводного водоема.

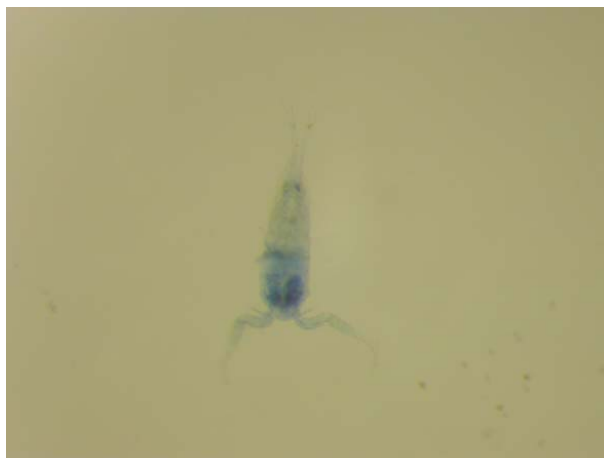
Травмированные особи окрашивались следующим образом. У обездвиженных особей дафний с травмированными антеннами, но с двигающимися грудными ножками окрашивался кишечник полностью (у крупных особей) или частично (у мелких), как и у боль-



а



б



в

Рис. 6. Неповрежденные особи дафнии (а), механически травмированные особи: б – копеподит циклопа и дафния, в – самец циклопа; все после стандартного окрашивания пробы

шинства живых нетравмированных особей (рис.6 а), у некоторых окрашивалось место травмы – часть головы или туловища (рис. 6 б). Место травмы окрашивалось и у циклопов, а если разрыв кутикулы оказывался большим, окрашивалась значительная часть тела циклопа (рис.6 в). У некоторых слабо травмированных особей окрашивались только фуркальные ветви или вся абдоминальная часть либо только антенны и часть головогруды. В общем, травмированные особи окрашивались не полностью, либо только по месту травмы, либо больше, но не более 1/2 или 2/3 всего тела. Краситель (производства SIGMA, USA, St.Louis) после многократного использования окрашивал части тела менее интенсивно и меньшую площадь у травмированных особей, чем свежеразведенная краска (производства SIGMA, Germany, Steinheim). В общем, рачков, окрашенных частично – не более 2/3 всего тела, следует относить при счетной обработке окрашенных проб к группе «живые особи», которые были живыми в водоеме в момент отбора проб.

При работе с витальным красителем нейтральный красный Танг с соавторами (Tang et al., 2006) также отмечали наличие в пробах зоопланктона (с доминированием *Acartia tonsa*) полуокрашенных особей, которые в каждом конкретном случае относились обработчиком пробы к группе либо живых, либо мертвых особей, а выделение их в отдельную группу при учете сочли нецелесообразным.

Особи, травмированные в водоеме хищниками, но еще живые в пробе из водоема, должны окрашиваться так же, как и травмированные живые особи в наших экспериментах. Если же они умерли не позднее 1 часа до отбора пробы, они должны окрашиваться полностью и быть отнесены к категории «мертвые». В этом случае они внесут вклад в смертность,

«не связанную с хищниками», которая и определяется на основе учета мертвых особей.

Пересмотр через 3-7 суток всех экспериментальных проб, зафиксированных и хранившихся в холодильнике, показал, что через несколько суток хранения проб интенсивность окраски трупов и травмированных особей может чуть уменьшиться, но результат дифференциации живых и мертвых по окраске остается тем же. Иногда ослабляется или исчезает окраска кишечника у живых особей. Мы обычно обрабатываем счетным методом в камере Богорова пробу зоопланктона через 3-7 дней после ее отбора, окраски и фиксации.

Заключение

В результате многолетних наблюдений за характером разложения и окраски трупов разного «возраста» и состояния (в том числе травмированных) можно дать следующие **методические рекомендации** для уменьшения ошибки подсчета числа мертвых ракообразных в пробах зоопланктона. В пробах, подвергнутых окраске анилиновым голубым для дифференциации на живых и мертвых (по Seepersad and Crippen, 1978; Гладышев, 1993), в качестве мертвых следует учитывать полностью или почти полностью (более чем 2/3 тела) окрашенные (синие) организмы. Это мертвые, умершие в интервале 1 час – менее 1-4 суток до отбора проб. Слабо окрашенных особей (светло-синих или голубых) или не окрашенных, но явно неживых, с видимыми признаками заселения их микрогетеротрофами, также учитывать как мертвых. Это рачки, умершие более чем 1-4 суток назад. Рачков обычного вида, но с окрашенными (синими или голубыми) фрагментами тела, т.е. частично окрашенных (около или менее 2/3 тела), следует относить к живым. Это травмированные рачки, бывшие живыми в водоеме в момент отбора проб. Нетравмированные или

слабо травмированные живые рачки обычно имеют окрашенный кишечник или его часть, так как, находясь в растворе краски, продолжают отфильтровывать взвешенные частицы, в том числе и частицы краски. В процессе хранения пробы окраска может стать менее интенсивной, однако суть дифференциации при этом не меняется.

Работа поддержана грантами Министерства образования и науки РФ и Американского фонда гражданских исследований и развития (CRDF) № REC-002 и Программы “Фундаментальные исследования и высшее образование” № PG07-002-1. Фотографирование и обработка кадров сделаны А. П. Толмеевым, за что автор ему очень признателен.

Список литературы

Гептнер М.В., Заикин А.Н., Рудяков Ю.А. (1990) Мертвые копеподы в планктоне: факты и гипотезы. Океанология. 30: 132-137.

Гладышев М.И. (1993) Устройство для окрашивания организмов зоопланктона с целью дифференциации живых и мертвых особей в фиксированных пробах. Гидробиол. журн. 29 (№ 2): 94-97.

Гладышев М.И., Губанов В.Г. (1996) Сезонная динамика удельной смертности *Bosmina longirostris* в лесном пруду, определенная на основе учета мертвых особей. Докл. АН. 348 (№ 1): 127 – 128.

Дубовская О.П. (1987) Вертикальное распределение живого и мертвого зоопланктона формирующегося Саяно-Шушенского водохранилища. Гидробиол. журн. 23(№ 6): 84-88.

Дубовская О.П. (2005) Динамика живого и мертвого зоопланктона в малом водохранилище бассейна Енисея. Вестник Красноярского государственного ун-та. 5: 161-168.

Дубовская О.П. (2006) Естественная смертность зоопланктона в водохранилищах бассейна Енисея. Автореф. дис. докт. биол. наук. СПб: ЗИН РАН. 35 с.

Дубовская О.П., Гладышев М.И., Губанов В.Г. (1999) Сезонная динамика численности живых и мертвых особей зоопланктона в небольшом пруду и некоторые варианты оценки смертности. Журн. общ. биологии. 60: 543-555.

Дубовская О.П., Гладышев М.И., Махутова О.Н. (2004) Сток лимнического зоопланктона через высоконапорную плотину и его судьба в реке с быстрым течением (на примере плотины Красноярской ГЭС на р. Енисей). Журн. общ. биологии. 65: 81-93.

Дубовская О.П., Семенченко В.П., Гладышев М.И., Бусева Ж.Ф., Разлуцкий В.И. (2007) Показатели смертности, не связанной с хищниками, у кладоцерного зоопланктона в пелагиали и литорали мелководного слабоэвтрофного озера. Докл. АН. 416(6): 836-838.

Зелезинская Л.А. (1966) Естественная смертность некоторых форм ихтио- и зоопланктона Черного моря. Автореф. дис. канд. биол. наук. Одесса: ОГУ. 20 с.

Кастальская-Карзинкина М.А. (1935) Методика определения живых и отмерших компонентов планктона на фиксированном материале. Труды Лимнол. станции в Косине. 19: 91-103.

Кастальская-Карзинкина М.А. (1937) Опыт применения метода учета живых и отмерших компонентов в изучении планктона Глубокого озера. Труды Лимнол. станции в Косине. 21: 143-167.

Коваль Л.Г. (1984) Зоо- и некрозоопланктон Черного моря. Киев: Наукова думка. 127 с.

Лебедева Л.П., Виноградов М.Е., Шушкина Э.А., Сажин А.Ф. (1982) Оценка интенсивности процесса детритообразования в морских планктонных сообществах. Океанология. 22: 652-659.

Наумова Е.Ю. (2006) Жизненные циклы и морфология представителей рода *Epischura* Forbes, 1882 (Copepoda: Calanoida). Автореф. дис. канд. биол. наук. Владивосток: ИБМ ДВО РАН. 22 с.

Павлова Е.В., Мельникова Е.Б. (2005) Изменения количественных показателей жизнеспособного зоопланктона Севастопольской бухты в 1998-1999 гг. (Крым, Черное море). Гидробиол. журн. 41(№ 6): 3-12.

Ряпенко Л.Н., Полюнов В.А. (1991) Использование метода окрашивания проционовым красным для оценки состояния зоопланктона на северном Байкале. В: Мониторинг и оценка состояния Байкала и Прибайкалья: Матер. 6 Всес. Бакальской шк.-сем. Л.: Ин-т глобального климата и экологии. С. 144-146.

Сергеева О.А., Калиниченко Р.А., Ленчина Л.Г., Медяник Е.В. (1989) Влияние системы охлаждения тепловой электростанции на планктон. Гидробиол. журн. 25(№ 6): 37-42.

Смельская М.В. (1995) Использование метода прижизненного окрашивания для оценки соотношения живых и мертвых особей в зоопланктоне оз. Галичского. Биол. внутр. вод. 98: 69-71.

Степанов В.Н., Светличный Л.С. (1981) Исследования гидромеханических характеристик планктонных копепод. Киев: Наукова думка. 128 с.

Телеш И.В. (1986) Трансформация озерного зоопланктона в реках. Докл. АН СССР. 291(№2): 495-498.

Фрайштат Д.М. (1980) Реактивы и препараты для микроскопии. Справочник. М.: Химия. 480 с.

Bloesch J., Burns N.M. (1980) A critical review of sediment trap technique. Schweiz. Z. Hydrol. 42: 15-55.

Dubovskaya O.P., Gladyshev M.I., Gubanov V.G., Makhutova O.N. (2003) Study of non-consumptive mortality of Crustacean zooplankton in a Siberian reservoir using staining for live/dead sorting and sediment traps. Hydrobiologia 504: 223-227.

Fleming J.M., Coughlan J. (1978) Preservation of vitally stained zooplankton for live/dead sorting // Estuaries. 1: 135-137.

Gladyshev M.I., Dubovskaya O.P., Gubanov V.G., Makhutova O.N. (2003) Evaluation of non-predatory mortality of two *Daphnia* species in a Siberian reservoir. J. Plankton Res. 25(№ 8): 999-1003.

Gries T., Gude H. (1999) Estimates of the nonconsumptive mortality of mesozooplankton by measurement of sedimentation losses. Limnol. Oceanogr. 44 (№ 2): 459-465.

Seepersad B., Crippen R.W. (1978) Use of aniline blue for distinguishing between live and dead freshwater zooplankton. J. Fish. Res. Board Canada. 35: 1363-1366.

Tang K.W., Freund C.S., Schweitzer Ch.L. (2006) Occurrence of copepod carcasses in the lower Chesapeake Bay and their decomposition by ambient microbes. Estuar. Coast. Shelf Sci. 68: 499-508.

Velimirov B. (1991) Detritus and the concept of non-predatory loss. Arch. Hydrobiol. 121: 1-20.

Wetzel R.G. (1995) Death, detritus, and energy flow in aquatic ecosystems. Freshwater Biol. 33: 83-89.

Evaluation of Abundance of Dead Crustacean Zooplankton in a Water Body Using Staining of the Samples by Aniline Blue Technique: Methodological Aspects

Olga P. Dubovskaya

*Institute of Biophysics of Siberian Branch of Russian Academy of Science,
Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

*Three long special experiments with killed by heating copepodites of *Cyclops vicinus*, *Mesocyclops leuckarti* (experiments 1 and 2), of *Cyclops vicinus* and *Daphnia longispina* group of different sizes and stages (experiment 3) were carried out to test an assumption that in proportion as decomposition and losses internal tissues of dead plankton crustaceans (by microorganisms-heterotrophs consumption), ability of dead tissues to take up stain Aniline blue and the intensity of their coloration are reduced. Besides, the methodical work on staining mechanically traumatized alive crustaceans was carried out to imitation of possible consequences of body injuries during zooplankton sampling and study of characteristics of their staining. The experiments have shown the more heterotrophes inside the dead carcasses, the less intensity of its staining. Depending on water temperature and morphological features of cladocerans and copepods, an "age" of dead crustaceans when it stops successfully stain is 1-4 days from death time. On the contrary carcasses of crustaceans, which dead during time interval "one hour – 1-3 days" are stained intensity and entirely. Mechanically traumatized alive crustaceans are stained not entirely, just spot of injury or more, but no more than one half or 2/3 of body. To increase accuracy of count of dead zooplankton in nature samples using Aniline blue staining method, suitable (proper) methodological recommendation are given.*

*Keywords: blue aniline stain, living and dead zooplankton, *Daphnia*, *Cyclops vicinus*, decomposition rate.*
