

УДК 579.68(285.23)

## **Микробиологическая характеристика открытых вод Байкала по данным общей численности микроорганизмов**

**В.В. Максимов\*, Е.В. Щетинина**

*НИИ биологии при Иркутском государственном университете,  
Россия 664003, г. Иркутск, ул. Ленина, 3<sup>1</sup>*

Received 9.09.2009, received in revised form 16.09.2009, accepted 23.09.2009

*В период максимального развития экосистемы проводились сравнительные исследования по определению общей численности микроорганизмов (ОЧМ) в водах Байкала различными методами. Значения ОЧМ в слое 0-10 м варьировали в диапазоне 1032-3434 тыс. по методу Разумова и от 1535 и до 2862 тыс. кл/мл с использованием красителя DAPI. В слое 50-100 м колебания ОЧМ незначительные: от 230 до 506 тыс. по прямому методу и от 220 до 590 тыс. кл/мл с использованием DAPI. По данным различных методов определения ОЧМ были получены сходные результаты, характерные для летне-осеннего периода пелагических участков Байкала.*

*Ключевые слова: общая численность микроорганизмов, эпифлуоресцентная микроскопия, Байкал.*

Определение общей численности микроорганизмов в естественных водах остается актуальным и на современном этапе исследований. Широко применяемый в настоящее время в мировой практике водной микробиологии метод учета количества клеток микроорганизмов на мембранных ультрафильтрах обладает погрешностями (Рукина, Бирюзова, 1952; Романенко 1974; 1985). Однако, используя метод прямого подсчета бактерий в олиготрофных водах Байкала, в течение 40 лет были выявлены закономерности функционирования микробных сообществ (Максимова, Максимов, 1989; Максимов и др., 2002; Максимова и др., 2005).

Все существующие методы определения численности микробных сообществ имеют свои недостатки (Hobbie, Daley, Jasper, 1977). Не лишен недостатков и эпифлуоресцентный метод с использованием бактериального фермента (Sameya, Hanashima, 1990), а также люминесцентный метод с использованием акридин-оранжевого (Харламенко, 1984; Hobbie, Ford, 1993). В настоящее время применяют различные методы флуоресцентного окрашивания и подсчета на фильтрах (Ymaguchi Nobuyasu, Nasu Masao, 1998). Краситель DAPI используют для изучения нуклеоидсодержащих клеток микробных сообществ. Этот метод считают одним из перспективных для оценки активной части

\* Corresponding author E-mail address: peterkb@mail.ru

<sup>1</sup> © Siberian Federal University. All rights reserved

бактериопланктона (Копылов, Косолапов, 1998).

В связи с тем, что на Байкале не проводились сравнительные исследования по определению численности микроорганизмов различными методами, целью данной работы было оценить сходимость результатов по определению общей численности микроорганизмов классическими и современными методами.

### Материал и методы исследования

В течение 2005-2007 гг. в летне-осенний период в открытых участках Байкала проводились исследования по определению общей численности микроорганизмов. Пробы воды с поверхности на микробиологический анализ отбирали батометром Молчанова, глубинные пробы – батометром Сорокина. Одновременно измеряли температуру и прозрачность воды.

Общую численность микроорганизмов определяли различными методами: методом прямого счета (Разумов, 1931), методом люминесцентной микроскопии с использованием красителя диамидаина-4',6-фенил-2-индолдихлоргидрата (DAPI) (Porter, Feig, 1980) и красителя акридина оранжевого. При использовании метода люминесцентной микроскопии пробы воды были использованы поликарбонатные фильтры марки «Nucleorog», которые окрашивали акридином оранжевым 0,015 % на фосфатном буфере при pH 7,0 (Харламенко, 1984).

Общую численность микроорганизмов (ОЧМ) методом прямого учета определяли на мембранных ультрафильтрах марки “Сынпор” с диаметром пор 0,23 мкм. Подсчет бактерий вели под микроскопом МББ-1А с иммерсионным объективом с увеличением в 1350 раз в 20 полях зрения.

Пробы воды для определения ОЧМ с помощью люминесцентной микроскопии

фиксируют профильтрованным безбактериальным формалином так, чтобы конечная концентрация формалина в пробе была 0,2 %. В воронку наливали 1-5 мл пробы, добавляли 50 мкл рабочего раствора DAPI и выдерживали 3-4 мин. После пробы фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм. Сразу после приготовления препарата производили подсчет микроорганизмов под микроскопом. Для микроскопии использовали световой фильтр с «возбуждающим» излучением 320-380 нм – в этом свете хорошо видны бактерии.

Для статистического анализа применяли метод t-критерия, вычисленный по средним данным (Смагунова, Козлов, 1990).

### Результаты и обсуждение

Для характеристики статуса водоема одним из важных показателей является общая численность микроорганизмов. Для характеристики олиготрофных вод Байкала мы параллельно использовали три метода определения общей численности микроорганизмов.

Полученные в 2005 г. результаты показали, что ОЧМ по прямому методу колебалась в Среднем Байкале от  $1689 \pm 219$  до  $2914 \pm 378$  в поверхностном слое и от  $1158 \pm 150$  до  $2000 \pm 260$  тыс. кл/мл на горизонте 7,5-10 м. Численность в слое 0-10 м составляла в среднем  $1829 \pm 237$  тыс. кл/мл. В Северном Байкале ОЧМ варьировала от  $1900 \pm 247$  до  $2774 \pm 554$  в поверхностном слое и от  $2032 \pm 335$  до  $2634 \pm 342$  тыс. кл/мл, составляя в среднем в слое 0-10 м  $2385 \pm 310$  тыс. кл/мл (рис.1).

В осенний период в слое 0-10 м наблюдаются более резкие колебания численности. В это время характерен интенсивный вертикальный водообмен в Байкале (Верболов, 1996; Безруков и др., 1998), который способствует неоднородному распределению микроорганизмов в поверхностных слоях. В

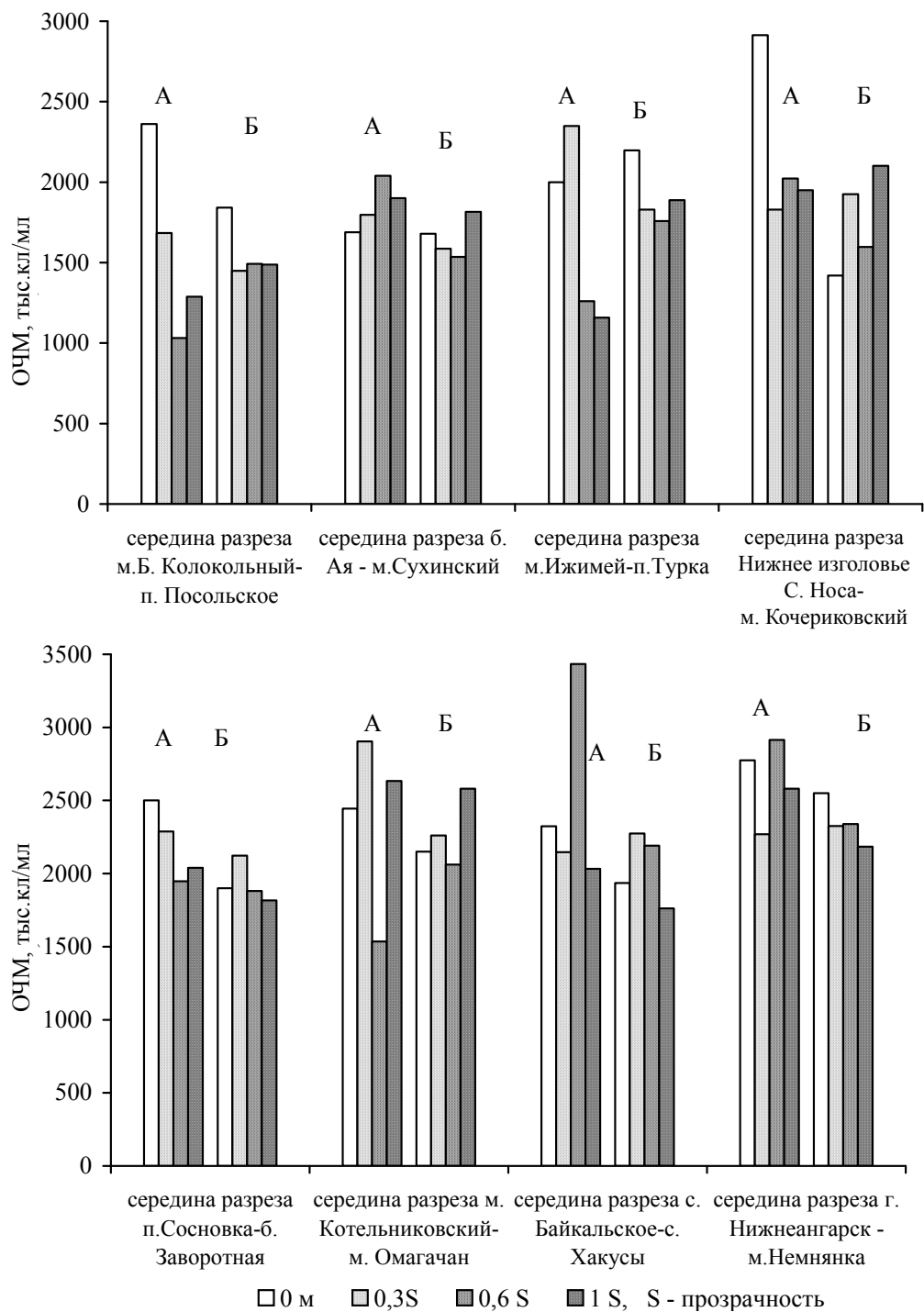


Рис. 1. Общая численность микроорганизмов в пелагических водах Байкала, подсчитанная прямым методом (А), методом DAPI (Б)

результате горизонтальных течений, сгонных и нагонных явлений в слое воды 0-10 м при температуре 8,8-13,1 °С количество микроорганизмов выражается значениями одного порядка.

Максимальное значение ОЧМ, до 3500 тыс. кл/мл, обнаружено на глубине 4 м в районе середины разреза с. Байкальское – Хакусы. Ранее нами было отмечено, что микробиологические показатели в северной котловине Байкала превышают таковые для средней его части (Максимов, 2002).

Небольшие глубины северной котловины служат одним из условий для создания благоприятного температурного и трофического режима в летне-осенний период. Одним из значимых факторов, определяющих более высокий уровень численности бактерий в северной котловине Байкала, является экспорт органического вещества с водами крупных рек, концентрация которых в пересчете на единицу площади значительно превышает таковую в средней и южной частях озера. Усиление роли вышеперечисленных факторов, по-видимому, обеспечивает наличие циркуляционного течения в северной котловине озера, которое формирует естественный гидрологический барьер между двумя котловинами (Шимараев, 1977; Шерстянкин, 1993). Из полученных данных следует, что общая численность микроорганизмов в 1,3 раза выше в Северном Байкале, чем в Среднем. В Среднем Байкале на станции Колокольная – Посольское заметно уменьшение микроорганизмов с глубиной (рис. 1). Определение численности микроорганизмов по DAPI показало, что средние значения численности также в 1,2 раза выше, чем в Среднем Байкале.

Таким образом, оба использованных метода определения численности микроорганизмов дают близкие результаты. Только в двух случаях численность, определенная этими

методами, расходилась в 2 раза. Все различия укладываются в пределы ошибки метода подсчета бактерий, которая экспериментально вычислена для условий Байкала и равна 13 % (Щетинина, 2003).

В 2007 г. при сравнении результатов определения численности с использованием трех различных красителей было установлено, что в 4 % случаев наибольшие показатели отмечены при окраске фильтров эритрозином (табл. 1). Данные ОЧМ, полученные с использованием DAPI и акридина оранжевого, сопоставимы и находились в диапазоне ошибки метода. Во всех трех случаях определения ОЧМ наблюдается достоверное уменьшение численности с глубиной. Увеличение численности на нижней границе эуфотического слоя отмечается при определении тремя методами, что связано, по-видимому, со скачком плотности воды, обусловленным термоклином в это время на этой глубине.

Результаты, полученные тремя методами, хорошо согласуются между собой, что свидетельствует о возможном применении их для условий Байкала.

Результаты статистической обработки данных по общей численности микроорганизмов, определенной прямым методом и методом DAPI, показали, что расхождения между двумя выборками случайны. Таким образом, обе методики дают одинаковые результаты:

$$t = 1,8 < t_{st} (0,05; 62) = 2,0,$$

где  $t$  – критерий Стьюдента, вычисленный;  $t_{st}$  – табличное значение критерия при уровне значимости 0,05 и числе степеней свободы 62.

Результаты исследований в 2006 г. в слое 0-100 м показали четкую картину распределения численности микроорганизмов с глубиной (табл. 2). На всех исследуемых станциях

Таблица 1. Общая численность микроорганизмов (тыс. кл/мл) на биосферной станции №1 (Большие Коты) оз.Байкал в августе 2007 г., учитываемая разными методами

Горизонт, м	Красители		
	DAPI	Эритрозин	Акридин оранжевый
0	910±118*	997±129	865±112
5	734±95	1010±131	712±92
10	725±94	736±95	680±88
25	486±63	1030±133	468±60
50	874±113	1050±136	838±108
100	662±86	770±100	642±83
150	360±46	400±52	440±57
200	455±59	432±56	434±56
250	414±53	420±54	412±53

\* Приведены средние значения (n=10) и стандартные ошибки.

Таблица 2. Общая численность микроорганизмов (тыс. кл/мл) в открытых участках Байкала в сентябре 2006 г.

Место отбора проб	Горизонт, м	ОЧМ, прямой метод	ОЧМ, DAPI	Прозрачность, м	T, °C
1	2	3	4	5	6
Середина разреза м. Кадильный – п. Ключевка	0	2315±300	1492±193	4,5	11,6
	5	1737±225	1669±216		10,9
	10	1911±248	2011±261		10,8
	50	242±31	356±46		4,4
	100	298±38	245±31		3,9
Середина разреза м. Б. Колокольный – п. Посольское	0	2122±275	2648±344	5	12,3
	5	1420±184	1985±258		12,1
	10	1774±230	2039±265		5
	50	282±36	234±30		3,9
	100	357±46	439±57		3,9
Середина разреза о. Кокуй – м. Крестовский	0	1807±239	1820±236	5	12,4
	5	1303±169	1870±243		12
	10	1570±204	2389±310		4,8
	50	318±41	364±47		4
	100	303±39	317±41		3,9
Середина разреза бухта Ая-м. Сухинский	0	900±117	951±123	6,5	13,1
	5	835±108	1506±195		13,1
	10	857±111	1009±131		12,9
	50	269±34	338±43		4
	100	488±63	220±28		4
Середина разреза м. Сухинский – центр створа пролива Ольхонские Ворота	0	1198±155	1445±187	8,5	12,2
	5	1355±176	1171±152		12,1
	10	1200±156	1103±143		10,8
	50	506±65	490±63		4,6
	100	340±44	292±37		4,1

Продолжение табл. 2

1	2	3	4	5	6
Середина разреза м. Ижмеев-п. Турка	0	2526±328	1524±198		9,8
	5	2060±267	1063±138		9,6
	10	1911±248	1268±164	4,7	8,8
	50	444±57	332±43		4,6
	100	290±37	385±50		4,1
Нижнее изголовье полуострова Святой Нос – м. Кочериковский	0	2222±288	1816±236		10,7
	5	2088±271	1344±174		10,1
	10	2393±311	1535±199	5,2	8,8
	50	230±29	281±36		4,6
	100	232±30	327±42		3,9
Середина разреза р. Сосновка-бухта Заворотная	0	1470±191	1247±162		8
	5	1278±166	1333±173		7,9
	10	466±60	663±86	7	7,6
	50	417±54	591±76		4,6
	100	286±37	285±37		3,8
Середина разреза с. Байкальское – Хакусы	0	1700±221	1755±228		10
	5	1260±163	1330±172		9,7
	10	1386±180	1708±222	6	9,7
	50	303±39	443±57		3,9
	100	313±40	234±30		3,8
Середина разреза г. Нижнеангарск – м. Немнянка	0	1453±188	1747±227		9,6
	5	1652±214	1510±196		8,9
	10	1223±158	1470±191	6,5	8,9
	50	247±32	313±40		3,7
	100	228±29	191±24		3,7

на глубине 50-100 м численность микроорганизмов уменьшается на порядок как по прямому методу, так и с использованием DAPI. Уменьшению численности микроорганизмов соответствует и резкое понижение температуры с глубиной.

По данным различных методов определения ОЧМ были получены сходные резуль-

таты, характерные для позднего периода летнего биологического сезона в пелагических участках Байкала. Метод прямого учета микроорганизмов на мембранных ультрафильтрах, со всеми его недостатками, показал хорошую сходимость результатов и может быть в дальнейшем использован для подсчета микроорганизмов в сравнительных целях.

Работа выполнена при частичной поддержке Аналитической ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы (2009-2010 гг.)» (проект РНП № 2.1.1/2880).

## Список литературы

Безруков Л.Б., Буднев Н.М., Максимов В.Н., и др. (1998) Свечение водной среды оз. Байкал – инструмент исследования динамики озера. Известия АН. Физика атмосферы и океана, 34(1): 97-103.

Верболов В.И. Течения и водообмен в Байкале (1996). Водные ресурсы, 23(4): 413-423.

Копылов А.И., Косолапов Д.Б. (1998) Характеристика различных биотопов Рыбинского водохранилища по общей численности и количеству бактерий, содержащих нуклеоиды. Микробиология, 67(6): 859-864.

Максимова Э.А., Максимов В.Н. (1989) Микробиология вод Байкала. Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та, 156 с.

Максимов В.В., Щетинина Е.В., Крайкивская О.В., Максимов В.Н., Максимова Э.А. (2002) Структура микробиоценозов и их активность как основа классификации и мониторинга состояния речных и приустьевых локальных экосистем Байкала. Микробиология, 71 (5): 690 – 696.

Максимова Э.А., Максимов В.Н., Максимов В.В. и др. (2005) Состояние микробиально-го планктона Южного Байкала. Свидетельство об официальной регистрации базы данных № 2005620059.

Разумов А.С. (1931) Прямой метод учета бактерий в воде. Сравнение его с методом Коха. Микробиология, 1(2): 131-136.

Романенко В.И. (1974) Новый метод определения численности живых бактерий в водоемах и сравнение его с методом Разумова А.С. Биология внутренних вод: Инфор. бюл. № 22: 18-21.

Романенко В.И. (1985) Микробиологические процессы продукции и деструкции органического вещества во внутренних водоемах. Л.: Наука, 295 с.

Рукина Е.А., Бирюзова В.И. (1952) Метод получения мембранных ультрафильтров для прямого счета, свободных от микробных клеток. Микробиология, 21(1): 60-65.

Смагунова А.Н., Козлов В.А. (1990) Примеры применения математической теории эксперимента в рентгенофлуоресцентном анализе. Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та, 230 с.

Харламенко В.И. (1984) Определение численности и биомассы водных бактерий эпифлуоресцентным методом с использованием отечественных ядерных микрофильтров. Микробиология, 53(1): 165-166.

Шерстянкин П.П. (1993) Оптические структуры и фронты океанического типа на Байкале. Автореф. дис. д-ра физ.-мат. наук. Институт океанологии РАН, 24 с.

Шимараев М.Н. (1977) Элементы теплового режима озера Байкал. Новосибирск: Наука, 147 с.

Щетинина Е.В. (2003) Микробиологические критерии формирования и устойчивости чистоты байкальских вод. Автореф. дис. канд. биол. наук. Иркутск, 18 с.

Hobbie J.E., Daley R.J., Jasper S. (1977) Use of Nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. Appl. Environ. Microbiol., 33(5): 1225

Hobbie J.E., Ford T.E. (1993) A perspective on ecology of aquatic microbes. Aquatic Microbiology. An ecological approach. Eds. Ford T.E. Boston: BlackWell Sci Publ., p.1.

Porter K.G., Feig Y. S. (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. Limnol. Oceanogr. 25: 943-947.

Sameya T., Hanashima M. (1990) Discrimination of bacteria from nonbacterial particles by a bacteriolytic enzyme treatment in fluorescent direct enumeration. 5-th Int. Symp. Microb. Ecol. (ISME 5). Kyoto. Aug. 27 Sept. 1, 1989. Abs. S.1, p 91.

Ymaguchi Nobuyasu, Nasu Masao. (1998) Analyses of aquatic bacteria at a single cell level (Review). Met. Fac. Pharm. Sc. Osaka Univ, 42, p. 5.

## **Microbiological Characteristic of Pelagic Waters of Lake Baikal According to Data of Total Number of Microorganisms**

**Vyacheslav V. Maximov and Elena V. Schetinina**  
*Research Center for Biology of Irkutsk State University  
3 Lenina st., Irkutsk, 664003 Russia*

---

*During the maximal development of Baikal ecosystem comparative researches by definition in water of an aggregate number of microorganisms (TNM) were carried out by various methods. Values of TNM in a layer of 0-10 m varied in a range of 1032-3434 thousand cells./ml on a direct method both from 1535 and up to 2862 thousand cells./ml with use of dye ДАPI. In a layer of 50-100 m fluctuations of TNM is insignificant: from 230 up to 506 thousand cells/ml on a direct method and from 220 up to 590 thousand cells./ml with use DAPI. According to various methods of definition of TNM similar results, characteristic for the pelagic sites of Baikal in summer-autumnal period have been found.*

*Keywords: total number of microorganisms, fluorescence microscopy, Baikal.*

---