

**Использование методов количественной оценки прикрепленных и агрегированных клеток бактерий для пресных вод.**

**Научный руководитель – Романова Надежда Дмитриевна**

***Никитина Мария Александровна***

*Студент (бакалавр)*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет почвоведения, Москва, Россия

*E-mail: nikitina.maria15@yandex.ru*

При анализе бактериопланктона естественных водоемов возникает проблема учета прикрепленных и агрегированных клеток. В зависимости от формы существования может различаться как активность, так и видовой состав прокариот. Традиционно для учета бактериопланктона использовали метод флуоресцентной микроскопии, однако из-за неравномерного распределения прикрепленных клеток их учет затруднен. Более того, использование цитометрии как более оперативного метода количественной оценки бактериопланктона не учитывает агрегаты и прикрепленные клетки. В данной работе мы оценили эффективность двух подходов предварительной подготовки проб, содержащих бактериальные обрастания (Epstein, Rossel, 1995; Linau et al., 2005) для учета общей численности бактерий в пресной воде с использованием предварительной ультразвуковой гомогенизации проб. Для отделения клеток бактерий от частиц взвеси в пробу добавляли метанол или пирофосфат натрия и обрабатывали пробу с помощью ультразвукового зонда, варьируя время обработки и диапазон мощности. Численность бактериопланктона, окрашенного флуорохромом SybrGreen II, оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии.

Результаты анализа данных представлены на диаграмме. При обработке ультразвуком при мощности 20% значения относительной численности, полученные с помощью микроскопии постепенно возрастали до 1 до 2.1 в пробах с добавлением пирофосфата при увеличении времени обработки проб с 30 до 90 с. (рис.1А) При увеличении мощности до 25% максимальная величина относительной численности (1.9) отмечалась при времени обработки 60 с, и снижалась при увеличении времени. При использовании метанола рост числа клеток, учтенных с помощью микроскопии, также наблюдался до 60 с, при дальнейшем увеличении времени обработки относительная численность снова снижалась. (рис.1В)

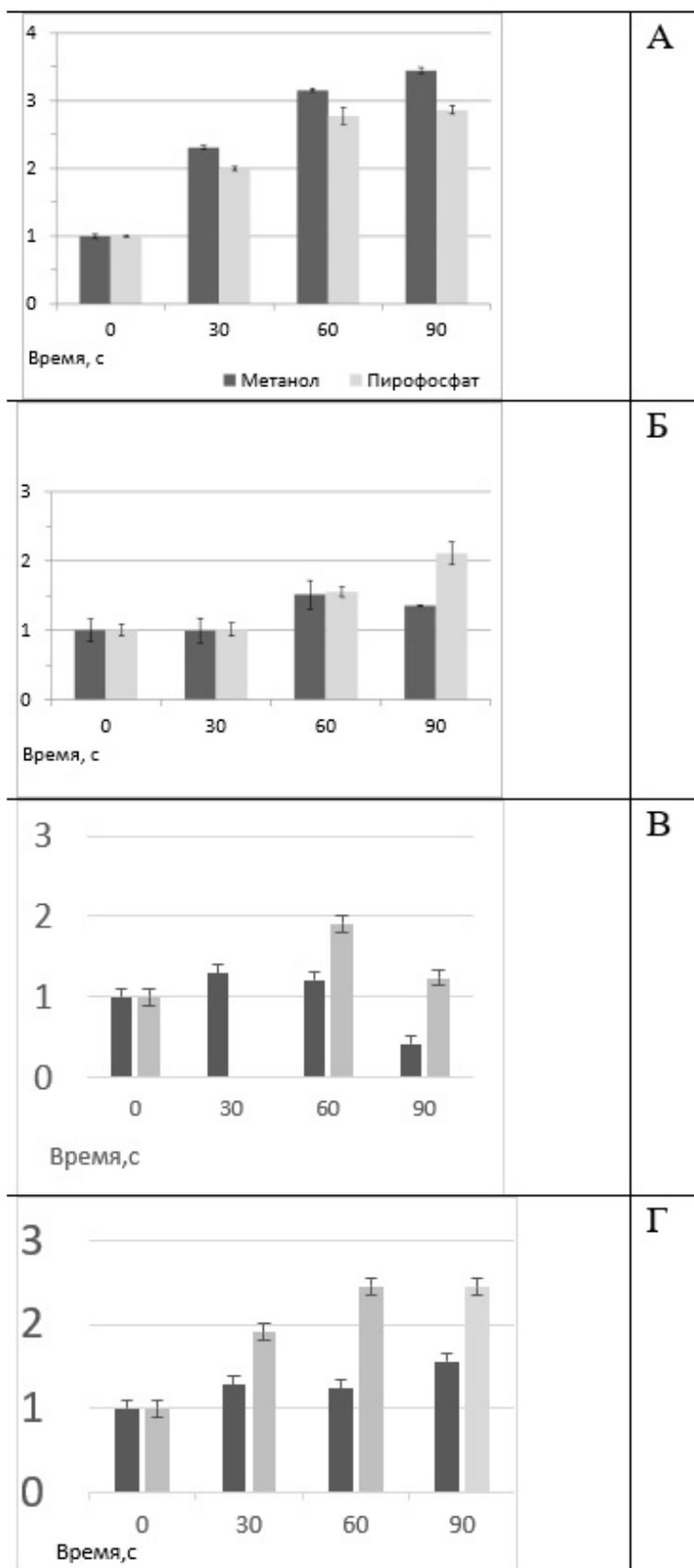
Анализ результатов с помощью цитометрии показал увеличение числа окрашенных частиц с ростом времени обработки проб до величин более чем в три раза превышающих исходную численность. Однако здесь стоит принимать во внимание, что в процессе цитометрии могут быть учтены и разрушенные в процессе обработки клетки и их части, окрашивающиеся применяемым красителем, но не учитываемые при микроскопии.

При оценке влияния величины используемой мощности ультразвукового гомогенизатора сходное увеличение численности как при обработке с помощью микроскопии, так и цитометрии, отмечалось на величине 20%. При дальнейшем увеличении графики разнонаправлены: прямой микроскопический анализ указывает на уменьшение числа клеток, тогда как результаты цитометрии указывают на его увеличение, что также может быть следствием учета остатков разрушенных клеток. Таким образом, независимо от метода пробоподготовки для учета численности прикрепленных клеток нельзя полагаться исключительно на цитометрический анализ, необходимо использовать прямой подсчет с помощью микроскопии как минимум в нескольких контрольных точках.

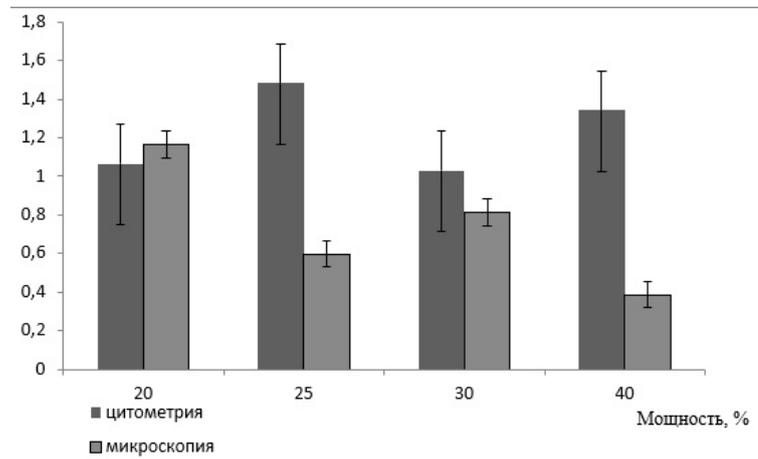
**Источники и литература**

- 1) Литература 1. Epstein S., Rossel J. Enumeration of sandy sediment bacteria: search for optimal protocol // Marine Ecology Progress Series. 1995. (117). С. 289–298. 2. Lunau M. et al. An improved method for counting bacteria from sediments and turbid environments by epifluorescence microscopy // Environmental Microbiology. 2005. № 7 (7). С. 961–968.

### **Иллюстрации**



**Рис. 1.** Рис.1 Относительное обилие бактерий при изменении времени обработки проб ультразвуковым зондом при А) цитометрии и Б) микроскопии. Мощность 20% В) микроскопия Г) цитометрия. Мощность 25%



**Рис. 2.** Рис.2 Оптимальные условия ультразвука при работе с пирофосфатом