

**Быкова Е.А.¹, Лабунская Е.А.¹, Краснова Е.Д.²,
Чергинцев Д.А.¹, Мамедова Д.Ф.¹, Дьякова А.Р.¹,**

Лунькова М.К.¹, Вишневская А.И.¹, Воронов Д.А.^{4,5}

(¹Кафедра физиологии растений, Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва, e-mail: styxelenalab@gmail.com; ²Беломорская биологическая станция им. Н.П. Перцова, Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва; ³Институт проблем передачи информации РАН, Москва; ⁴Институт физико-химической биологии им. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва)

**Метод оценки плотности микроводорослей рода
Rhodomonas в меромиктическом водоеме (лагуне на
Зеленом мысе) в окрестностях Беломорской биостанции
МГУ**

**Bykova E.A.¹, Labunskaya E.A.¹, Krasnova E.D.², Chergintsev
D.A.¹, Mamedova D. F.¹, Dyakova A. R.¹, Lunkova M. K.¹,
Vishnevskaya A.I.¹**

(¹Plant physiology department, Biological faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow; ²Pertsov White Sea Biological Station Biological faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow; ³A.Kharkevich Institute for Information Transmission Problems of RAS, Moscow; ⁴A.N.Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology of Lomonosov Moscow State University, Moscow)

**Method of estimation of *Rhodomonas* sp. microalgae density in
a meromictic lake (a lagoon on the Cape Zeleny) in the vicinity
of the White Sea Biological Station of MSU**

Ключевые слова: отделяющиеся от моря водоемы, меромиксия, криптофитовые водоросли, Белое море, хлорофиллы, фикоэритрин, методы оценки численности микроводорослей.

Важной задачей при комплексном мониторинге меромиктических водоемов является оценка численности фитопланктонных организмов, занимающих различные слои. Данная работа показывает, что для оценки численности криптофитовой водоросли *Rhodomonas* sp. в зоне хемоклина можно использовать как концентрацию хлорофилла *a*, так и концентрацию фикоэритрина.

Меромиктические озера – актуальный объект лимнологических исследований. В окрестностях ББС МГУ находится ряд меромиктических озер с высокой степенью стратификации водной толщи и слоями, которые отличаются друг от друга по физико-химическим параметрам и по составу фитопланктона. В верхней аэробной зоне можно обнаружить различные эукариотические организмы, для анаэробной зоны характерны микробные

сообщества, в том числе осуществляющие анаэробный фотосинтез. Особый интерес представляет зона хемоклина – область перехода от аэробной зоны к анаэробной, с высокой плотностью микроорганизмов. Особенность исследуемого водоема – наличие слоя из ярко окрашенных криптофит *Rhodomonas* sp. Они доминируют по численности и биомассе, что позволяет использовать спектрофотометрические методы для оценки их численности [1].

Водоросли из рода *Rhodomonas* имеют монадный тип дифференциации таллома и относятся к отделу Cryptophyta. Пластиды, полученные в результате вторичного эндосимбиоза от красных водорослей (Rhodophyta), содержат хлорофиллы *a* и *c*₂, а также фикоэритрин 545, расположенный в люмене тилакоидов. Большинство спектрофотометрических методов для оценки численности фотосинтезирующих организмов использует концентрацию хлорофилла *a*. Однако в случае фотосинтетиков, содержащих в достаточном количестве фикобилины, представляется возможным использование их для оценки численности клеток.

Целью данной работы было получение калибровочных кривых для оценки плотности *Rhodomonas* sp. в лагуне на Зеленом мысе (Белое море, Кандалакшский залив, окрестности Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова МГУ им. М.В. Ломоносова) по хлорофиллу *a* и по фикоэритрину.

Для выделения пигментов и подсчета количества клеток *Rhodomonas* sp. пробы из зоны хемоклина (глубина 5,5 м) пробы, отобранные в лагуне на Зеленом мысе с помощью погружного насоса, сразу помещали в пластиковые емкости, обернутые фольгой для предотвращения разрушения пигментов на свету. Для получения зависимости концентрации пигмента от количества клеток необходимо было сделать разведения исходной пробы в 2, 3, 4 и 8 раз. Каждое разведение делали в трех повторностях. Для разведения использовали отфильтрованную через бумажный фильтр морскую воду. Для экстракции фикоэритринов отбирали по 45 мл из полученных разведений и помещали в центрифужные пробирки на 50 мл. Для более эффективного осаждения мы охлаждали пробы в морозильной камере в течение 10 минут, центрифугировали в течение 10 минут на 3000 г^{см}, сливали не содержащий клеток супернатант. К осадку доливали по 45 мл исходной пробы, после чего снова охлаждали в морозильной камере в течение 10 минут и проводили повторное центрифугирование. Для сохранения свойств фикоэритринов в пробы добавляли по 15 мл фосфатного буфера pH 6,7 (0.05 М КН₂РO₄, 0.05 М К₂НРO₄) и ресуспендировали осадок. Для лучшего выделения фикоэритрина пробы, залитые буфером, помещали в морозильную камеру на –18°С на ночь до полного замерзания, после чего размораживали при

комнатной температуре в течение 5–6 часов, помещая пробирки в емкость с водой комнатной температуры для ускорения размораживания. Для полного высвобождения пигментов полностью размороженные пробы подвергали ультразвуковой обработке в течение 10 минут. Перед проведением измерения пробы центрифугировали 10 минут на 5000 г_г. Оптическую плотность полученных растворов определяли на спектрофотометре СФ-2000 при 455, 564, 592, 750 нм против фосфатного буфера. Полученные значения оптической плотности служили материалом для пересчета концентрации пигмента по формуле [2]:

$$PE \text{ (mg/ml)} = [(A_{564} - A_{592}) - (A_{455} - A_{592}) * 0.2] * 0.12$$

Для экстракции хлорофиллов действия по осаждению и концентрированию клеток были аналогичными. Далее в пробы добавляли по 15 мл 100% ацетона, после чего ресуспендировали осадок. Затем пробирки с ацетоновым экстрактом хлорофилла центрифугировали 10 минут на 5000 г_г. Оптическую плотность экстракта хлорофилла измеряли при 630, 663 и 750 нм в кварцевых кюветах против 100% ацетона. Концентрации хлорофилла *a* рассчитывали с использованием полученных значений оптических плотностей по следующей формуле [3]:

$$C_{\text{Chla}} \text{ (мкг\мл)} = 11,43D_{663} - 0,64D_{630}$$

Для того чтобы учесть возможные колебания содержания пигментов днем и ночью, пробы отбирали в разное время суток: в полночь и в полдень.

Подсчет клеток проводили в камере Нажотта для каждого разведения отдельно. Таким образом, оказалось возможным установить соответствие между определенным количеством клеток в объеме пробы из зоны хемоклина и содержанием пигмента (хлорофилла *a* либо фикоэритрина) в данном объеме.

Используя эти данные, мы получили калибровочные кривые зависимости концентрации пигмента, полученного из клеток, содержащихся в 1 мл пробы воды из озера от числа клеток в данной пробе (рис. 1, 2).

Следует отметить, что стандартное отклонение концентрации пигмента не выходило за пределы 5% как для хлорофилла *a*, так и для фикоэритрина.

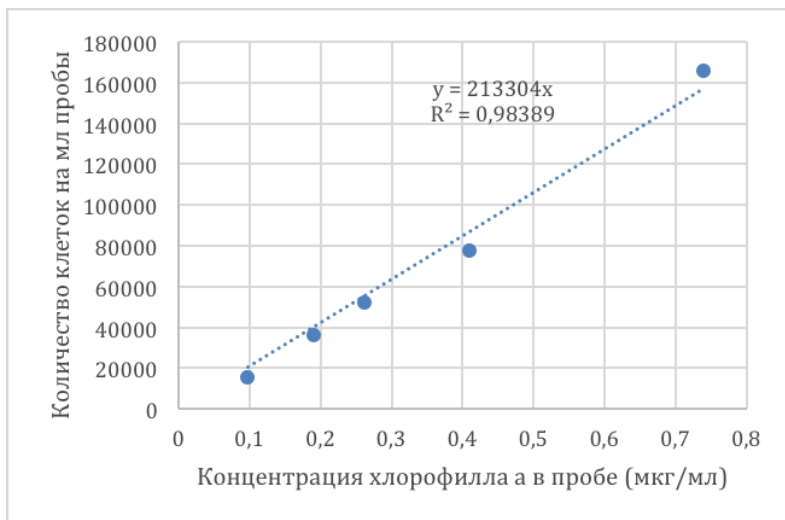


Рисунок 1. Зависимость концентрации хлорофилла *a* в объеме пробы воды из озера от количества клеток в дневной пробе.

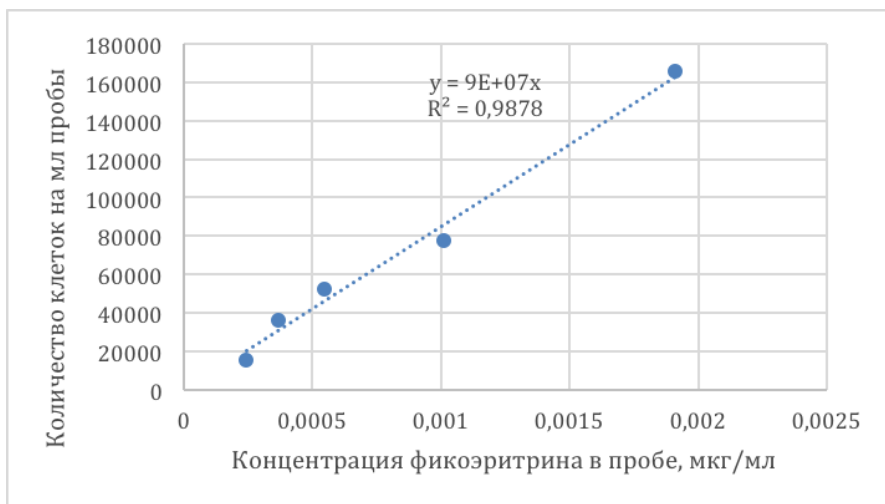


Рисунок 2. Зависимость концентрации фикоэритрина в объеме пробы воды из озера от количества клеток в дневной пробе.

Фикоэритрин также показывает хорошую корреляцию с количеством клеток, хотя значения коэффициента корреляции немного ниже, чем для хлорофилла *a*. Также в большей степени, чем для хлорофилла *a*, различаются

дневная и ночная калибровки (для дневной уравнение $y=9 \cdot 10^7 x$, для ночной – $y=6 \cdot 10^7 x$). Не исключено, что содержание фикоэритрина в связи с его антенной функцией может быть менее стабильно, чем хлорофилла *a*, однако это требует дальнейших исследований.

Таким образом, мы показали, что для оценки численности *Rhodomonas* может использоваться как хлорофилл *a*, который применяется для решения подобных задач на других фитопланктонных организмах, так и фикоэритрин, экстракцию которого можно провести без ацетона, в полевых условиях, если есть возможность заморозить пробы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 19-05-00377).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kasprzak P., Padisák J., Koschel R. et al. Chlorophyll *a* concentration across a trophic gradient of lakes: An estimator of phytoplankton biomass? // *Limnologica*. 2008. V. 38. P. 327–338.
2. Beer S., Eshel A. Determining phycoerythrin and phycocyanin concentrations in aqueous crude extracts of red algae // *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 1985. V. 36. P. 785–792.
3. Jeffrey S.W., Humphrey G.F. New spectrophotometric equations for determining chlorophyll *a*, *b*, *c*1 and *c*2 in higher plants and natural phytoplankton. *Bioch. Physiol. Pflanz.* 1975. V. 165. P. 191–194.

An important task in the integrated monitoring of meromictic water bodies is to assess the number of phytoplankton organisms occupying different layers. This work shows that to assess the number of cryptophytic algae *Rhodomonas* sp. in the chemocline zone, both the concentration of chlorophyll *a* and the concentration of phycoerythrin can be used.

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ ОКЕАНОЛОГИИ ИМ. П.П. ШИРШОВА РАН**

**ГЕОЛОГИЯ
МОРЕЙ И ОКЕАНОВ**

**Материалы XXIII Международной научной конференции
(Школы) по морской геологии**

Москва, 18–22 ноября 2019 г.

Том III

**GEOLOGY
OF SEAS AND OCEANS**

**Proceedings of XXIII International Conference on Marine
Geology**

Moscow, November 18–22, 2019

Volume III

Москва / Moscow
ИО РАН / IO RAS
2019

ББК 26.221

Г35

УДК 551.35

DOI:10.29006/978-5-9901449-7-2.ICMG-2019-3

Геология морей и океанов: Материалы XXII Международной научной конференции (Школы) по морской геологии. Т. III. – М.: ИО РАН, 2019. – 306 с. DOI:10.29006/978-5-9901449-7-2.ICMG-2019-3.

В настоящем издании представлены доклады морских геологов, геофизиков, геохимиков и других специалистов на XXII Международной научной конференции (Школе) по морской геологии, опубликованные в пяти томах.

В томе III рассмотрены проблемы изучения рассеянного осадочного вещества геосфер, а также исследований по проблемам «Система Белого моря» и «Система Каспийского и Аральского морей».

Ответственный редактор

Академик А.П. Лисицын

Редакторы к.г.-м.н. Н.В. Политова, к.г.-м.н. В.П. Шевченко

Geology of seas and oceans: Proceedings of XXII International Conference on Marine Geology. Vol. III. – Moscow: IO RAS, 2019. –306 pp. doi:10.29006/978-5-9901449-7-2.ICMG-2019-3.

The reports of marine geologists, geophysicists, geochemists and other specialists of marine science at XXII International Conference on Marine Geology in Moscow are published in five volumes.

Volume III includes reports devoted to the problems of investigations of dispersed sedimentary matter in geospheres, and the investigations on problems “White Sea system” and “Caspian and Aral seas system”.

Chief Editor

Academician A.P. Lisitzin

Editors Dr. N.V. Politova, Dr. V.P. Shevchenko

ISBN 978-5-9901449-7-2

ББК 26.221

© ИО РАН 2019