

МЕТОД ОЦЕНКИ ПЛОТНОСТИ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ РОДА *RHODOMONAS* В МЕРОМИКТИЧЕСКОМ ВОДОЕМЕ (ЛАГУНЕ НА ЗЕЛЕНОМ МЫСЕ) В ОКРЕСТНОСТЯХ БЕЛОМОРСКОЙ БИОСТАНЦИИ МГУ

**Вишневская Анна Игоревна¹, Дьякова Арина Романовна¹,
Лунькова Мария Константиновна¹, Мамедова Джамиля
Фархадовна¹, Чергинцев Денис Александрович¹, Быкова
Екатерина Алексеевна¹, Воронов Дмитрий Анатольевич^{3,4},
Лабунская Елена Алексеевна¹, Краснова Елена Дмитриевна²**

¹ Кафедра физиологии растений, Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва,

² Беломорская биологическая станция им. Н.П. Перцова, Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва,

³ Институт проблем передачи информации РАН, г. Москва,

⁴ Институт физико-химической биологии им. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

Введение

Важной задачей при комплексном мониторинге меромиктических водоемов, представляющих актуальный объект лимнологических исследований, является оценка численности фитопланктонных организмов, занимающих различные слои.

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. Особый интерес представляет зона хемоклина – область перехода от аэробной зоны, в которой в основном обитают эукариотические организмы, к анаэробной, населенной микроорганизмами, осуществляющими аноксигенный фотосинтез. Особенность исследуемого водоема – наличие слоя из ярко окрашенных криптофитовых водорослей *Rhodomonas* sp., доминирующих по численности и биомассе, что позволяет использовать спектрофотометрические методы для оценки их плотности [Kasprzak et al., 2008].

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 *c2*, а также фикоэритрин 545, расположенный в люмене тилакоидов. Большинство спектрофотометрических методов для оценки численности фотосинтезирующих организмов использует концентрацию хлорофилла *a*, однако для избирательного определения криптофитовых лучше подходят фикобиллины.

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.

Данные и методы

Для выделения пигментов и подсчета количества клеток *Rhodomonas sp.* пробы из зоны хемоклина (глубина 5,5 м), 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 приготовить разведения исходной пробы в 2, 3, 4 и 8 раз, сделанное 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 при 3000 rpm, 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 рН 6,7 (0.05 М KH_2PO_4 , 0.05 М K_2HPO_4) и ресуспендировали осадок. Для лучшего выделения фикоэритрина пробы, залитые буфером, помещали в морозильную камеру на -18°C 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 качественного высвобождения пигментов полностью размороженные пробы подвергали ультразвуковой обработке в течение 10 минут. Перед проведением измерения пробы центрифугировали 10 минут на 5000 rpm. Оптическую плотность полученных растворов определяли на спектрофотометре СФ-2000 при длинах волн 455, 564, 592, 750 нм против фосфатного буфера. Полученные значения оптической плотности использовали для пересчета концентрации пигмента по формуле [2]:

$$C_{\text{PE}} (\text{мкг/мл}) = [(A_{564} - A_{592}) - (A_{455} - A_{592}) \times 0.2] \times 0.12$$

Для экстракции хлорофиллов осаждение и концентрирование клеток проводили аналогично. Далее в пробы добавляли по 15 мл 100% ацетона, после чего ресуспендировали осадок. Затем пробирки с ацетоновым экстрактом хлорофилла центрифугировали 10 минут на 5000 rpm. 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]:

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

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

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

Результаты

По полученным данным мы построили 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).

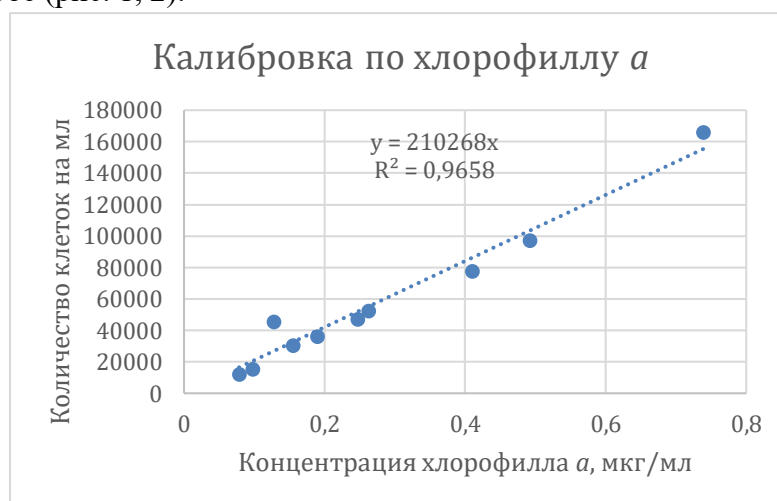


Рисунок 1. Зависимость концентрации хлорофилла *a* в объеме пробы воды из озера от количества клеток.

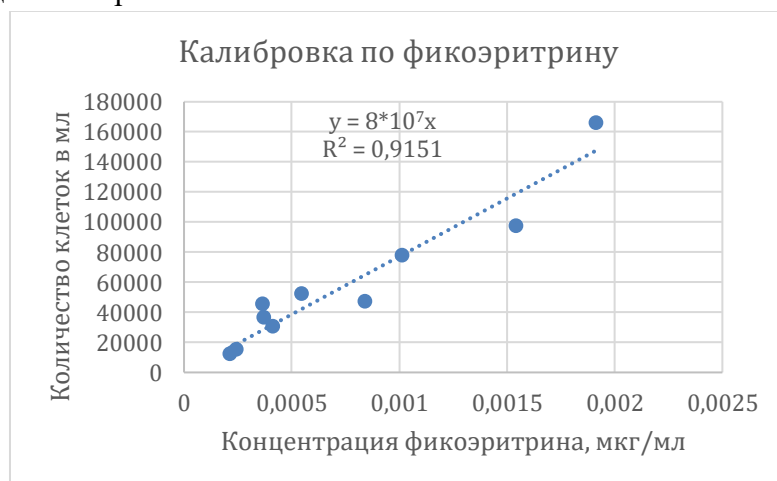


Рисунок 2. Зависимость концентрации фикоэритрина в объеме пробы воды из озера от количества клеток.

Стандартное отклонение концентрации пигмента оставалось в пределах 5% как для хлорофилла *a*, так и для фикоэритрина.

Фикоэритрин также показывает хорошую корреляцию с количеством клеток, хотя значения коэффициента корреляции немного ниже, чем для хлорофилла *a*. Не исключено, что содержание фикоэритрина в связи с его антенной функцией может быть менее стабильно, чем хлорофилла *a*, однако это требует дальнейших исследований.

Заключение

Таким образом, мы показали, что для оценки плотности *Rhodomonas* sp. 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.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант №19-05-00377). Коллектив авторов благодарит заместителя декана по научной работе факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ им. Ломоносова Фенюка Бориса Александровича за предоставление в пользование спектрофотометра и комплектующих к нему.

Список литературы

1. 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.
2. Jeffrey S.W, Humphrey G.F. New spectrophotometric equations for determining chlorophyll a, b, c1 and c2 in higher plants and natural phytoplankton. Bioch. Physiol. Pflanz. – 1975. – V.165. – P. 191–194.
3. Kasprzak P, Padisák J, Koschel R., Krienitz L., Gervais F. Chlorophyll *a* concentration across a trophic gradient of lakes: An estimator of phytoplankton biomass? // Limnologia. 2008. – V. 38. – P. 327–338.



**VIII Международная научно-практическая конференция
«Морские исследования и образование»
Москва, 28-31 октября 2019**

**VIII International conference
«Marine Research and Education»
Moscow, 28-31 October 2019**

MARESEDU-2019

**ТРУДЫ КОНФЕРЕНЦИИ / CONFERENCE PROCEEDINGS
Том II (II) / Volume II (II)**

УДК [551.46+574.5](063)

ББК 26.221я431+26.38я431+28.082.40я431

T78

Труды VIII Международной научно-практической конференции «Морские исследования и образование (MARESEDU-2019)» Том II (III): [сборник]. Тверь: ООО «ПолиПРЕСС», 2020, 518 с.: ISBN 978-5-6042986-0-2.

Сборник «Труды VIII Международной научно-практической конференции «Морские исследования и образование (MARESEDU-2019)» представляет собой книгу тезисов докладов участников конференции, состоящую из трех томов. Сборник включает в себя главы, соответствующие основным секциям технической программы конференции: океанология, гидрология, морская геология и геофизические исследования на акваториях, рациональное природопользование, подводное культурное наследие. Специальной темой конференции 2019 года стала секция, приуроченная к Десятилетию ООН, посвященному науке об Океане в интересах устойчивого развития (2021-2030 гг.)

Все тезисы представлены в редакции авторов.

В рамках конференции участники обсудили состояние и перспективы развития комплексных исследований Мирового океана, шельфовых морей и крупнейших озер, актуальные проблемы рационального природопользования и сохранения биоразнообразия в водных пространствах, проблемы освоения ресурсов континентального шельфа, достижения науки в области морской геологии, современные подходы к исследованиям обширных акваторий дистанционными методами, проблемы устойчивого развития экосистем моря и прибрежной зоны, организацию и проведение комплексных экспедиционных исследований, преподавание «морских дисциплин», вопросы организации полевых практик студентов.

Подготовлено к выпуску издательством ООО «ПолиПРЕСС» по заказу ООО «Центр морских исследований МГУ имени М.В. Ломоносова».

ООО «ПолиПРЕСС»

170041, Россия, г. Тверь, Комсомольский
пр-т, д. 7, пом. II polypress@yandex.ru

ООО «Центр морских исследований МГУ
имени М.В. Ломоносова».

РФ, 119234, г. Москва, ул. Ленинские
Горы, д. 1, стр. 77

(495) 648-65-58/ 930-80-58

Все права на издание принадлежат
ООО «Центр морских исследований
МГУ имени М.В. Ломоносова».

© ООО «Центр морских исследований
МГУ имени М.В. Ломоносова», 2020
© ООО «ПолиПРЕСС»