

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ФОТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В РАЗНЫХ СЛОЯХ МОРСКИХ МЕРОМИКТИЧЕСКИХ ВОДОЕМОВ НА ПОБЕРЕЖЬЕ БЕЛОГО МОРЯ

*Калмацкая Олеся Алексеевна¹, Мещанкин Андрей Вячеславович¹, Воронов Дмитрий Анатольевич²,
Краснова Елена Дмитриевна³, Лаптинский Кирилл Андреевич¹, Лялин Игорь Игоревич¹, Медвецкая Ирина
Юрьевна¹, Никольский Кирилл Сергеевич¹, Пацаева Светлана Викторовна¹, Харчева Анастасия
Витальевна¹, Чебанова Марианна Кирилловна⁴*

¹-Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва,

²-Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Москва,

³-Беломорская биологическая станция им. Н.А. Перцова Биологического факультета МГУ им. М.В.
Ломоносова, пос. Приморский, Карелия

⁴-Институт водных проблем РАН, Москва

Работа посвящена исследованию методами абсорбционной спектроскопии разных слоев воды в стратифицированных водоемах, отделяющихся от Белого моря. Измерены спектры поглощения для проб воды с различной глубины для нескольких водоемов и по ним построены вертикальные профили распределения фототрофных микроорганизмов, обитающих в меромиктических озерах Белого моря. Сделаны выводы о концентрации фотосинтезирующих одноклеточных на различной глубине в каждом озере.

Объекты исследования — озера Кисло-Сладкое, Нижнее Ершовское, Трехцветное, Еловое и лагуна на Зеленом мысу, — расположены в окрестностях Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова МГУ им. М.В. Ломоносова.

- Озеро Кисло-Сладкое имеет максимальную глубину 4,5 м, соленая вода проникает в озеро во время сизигийных приливов.
- Озеро Трехцветное - имеет максимальную глубину 6 м, вода глубинных слоев соленая с сильным запахом сероводорода.
- Озеро Нижнее Ершовское - имеет максимальную глубину 2.5 м, за исключением придонных слоев, водоем пресный.
- Озеро Еловое - имеет максимальную глубину 5,5 м, озеро является пресноводным до глубины 1.5 м, далее соленость увеличивается.
- Лагуна на Зеленом мысу с максимальной глубиной 6,5 м является частично изолированным водоемом, в который соленая вода попадает с приливом через порог, соединяющий лагуну с Кислой губой.

Известно, что реликтовые беломорские озера содержат цветные слои, окраска которых вызвана содержанием в них различных бактерий и одноклеточных водорослей [1-3]. Оттенок и насыщенность цвета слоя зависит от вида и концентрации обитающих на этой глубине микроорганизмов. Отбор проб проводился в августе 2014 года в рамках студенческой практики физического факультета МГУ, а также в ходе международной Школы-конференции по оптике прибрежных вод. Отбор проб производили в месте максимальной глубины от поверхности до дна с шагом 0,5 м, уменьшая шаг до 0,1 м в области цветных слоев. Измерение спектров поглощения проводили в лабораторных условиях с помощью спектрофотометра HITACHI-557 в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см.

В спектрах поглощения разных фотосинтетических пигментов отличаются положения максимумов. Хлорофилл а водорослей поглощает в области длин волн от 600 до 700 нм, максимум поглощения бактериохлорофилла с,d,e зеленых серобактерий находится в диапазоне 700-800 нм, для бактериохлорофилла пурпурных бактерий пик располагается в дальней красной области спектра (более 800 нм) [4]. Измеряя спектр поглощения воды, можно определить преобладающую в ней группу фотосинтезирующих микроорганизмов.

На рис.1 представлены спектры оптической плотности водных проб озера Кисло-Сладкое (а) и лагуны на Зеленом мысу (б). По мере увеличения глубины слоя воды оптическая плотность исходных проб воды возрастает, что, по-видимому, связано с увеличением концентрации взвешенных частиц в воде и, следовательно, увеличением рассеяния на них.

В спектрах оптической плотности воды до глубины 2 м в Кисло-Сладком и до глубины 5 м лагуна на Зеленом мысу присутствуют очень слабые полосы поглощения каротиноидов и нативного хлорофилла а водорослей и цианобактерий. Однако использовать эти полосы для определения концентрации кислородных микроорганизмов непосредственно в исходной пробе воды без экстрагирования органическим растворителем не представляется возможным из-за превалирования вклада рассеяния в спектр оптической плотности воды.

Начиная с определенной глубины, в спектрах поглощения воды из обоих озер присутствует пик в области длин волн 720-725 нм: Для Кисло-Сладкого это глубины ниже 2,3 м, для лагуны на Зеленом мысу - от 5,1 м. Данная полоса обусловлена перекрывающимися пиками поглощения бактериохлорофиллов с,d,e зеленых серобактерий и свидетельствует о наличии таковых в нижних слоях исследованных водоемов. Этот вывод подтверждается сильным запахом сероводорода водных проб глубинных слоев.

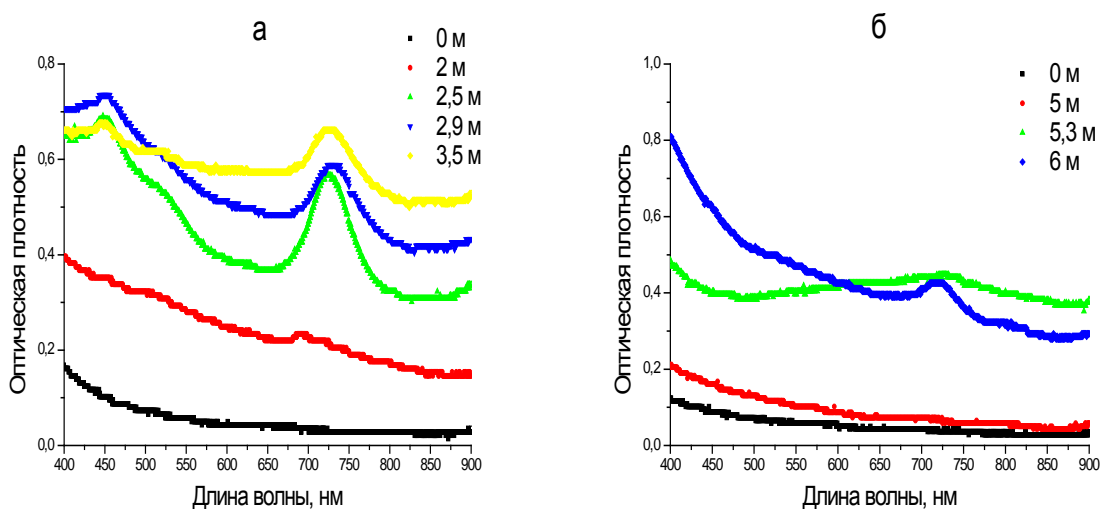


Рис.1 Спектры поглощения воды исследованных водоемов с различной глубины: а) озеро Кисло-Сладкое; б) лагуна на Зеленом мысу

По площади полосы поглощения в спектрах можно судить о концентрации микроорганизмов в воде. Для количественной оценки содержания фотосинтезирующих организмов был проведен расчет площадей полос поглощения в области длин волн 720-725 нм с учетом рассеяния (вычитанием базовой линии светорассеяния из спектра оптической плотности) и построены распределения этой величины по глубине (рис.2).

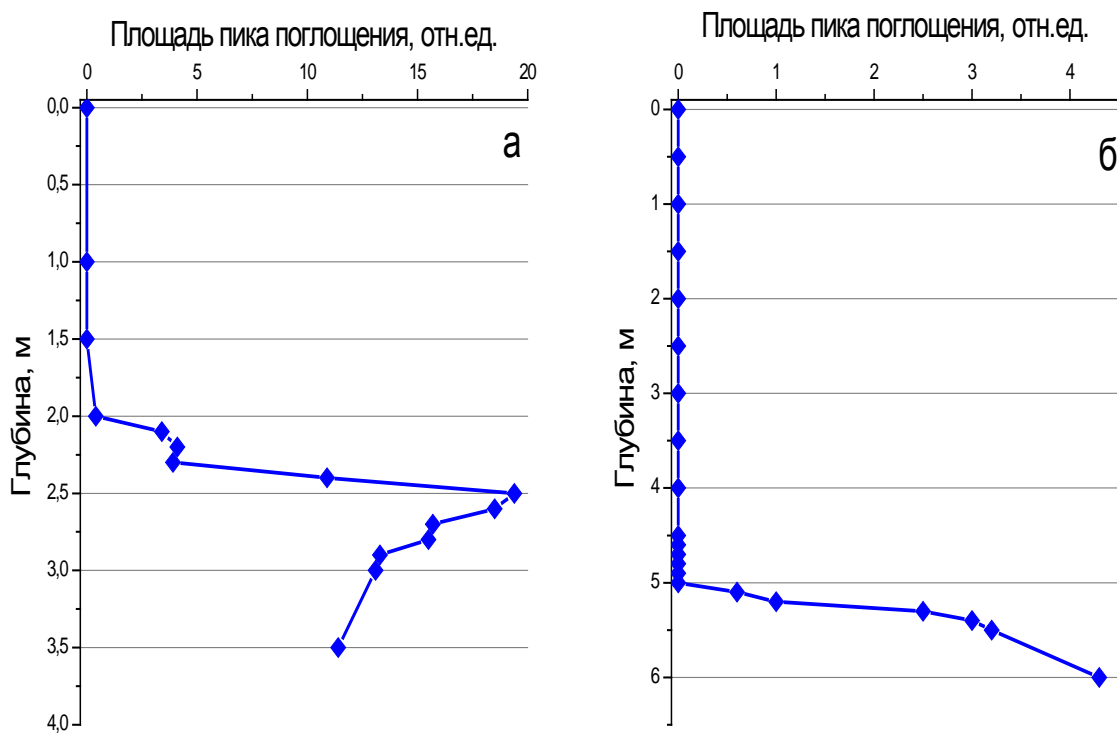


Рис.2 Зависимость поглощения бактериохрофилла от глубины: а) озеро Кисло-Сладкое; б) лагуна на Зеленом мысу

Из графиков следует, что в озере Кисло-Сладком на глубине 2,4 м начинается резкое возрастание содержания аноксигенных фототрофов – зеленых серобактерий, максимальная концентрация которых, определенная по спектрам поглощения, приходится в озере Кисло-Сладком на глубину 2,5 м. Все это соответствует тому, что мы увидели в этих пробах под флуоресцентным микроскопом – в слое от 2 до 2,5 м мы обнаружили большое количество кокков зеленого цвета, по всей видимости – синезеленых водорослей. Ниже происходит снижение количества цианобактерий в водных пробах (по данным микроскопии) и возрастание количества серобактерий (по данным спектрофотометрии)..

В придонном слое сохраняется достаточно высокая концентрация фототрофных микроорганизмов: величина поглощения на глубине 3,5 м составляет более половины от максимальной. Наличие большой концентрации серных бактерий на глубинах 2,4-3,5 м соответствует измерениям спектров флуоресценции воды бактериохлорофилла для тех же проб [5], однако максимальная интенсивность флуоресценции приходится на глубину 3,5 м отсутствует. Это можно объяснить различным физиологическим состоянием или видовым различием серобактерий в слоях глубинной воды.

В лагуна на Зеленом мысу характер зависимости величины поглощения на длине волны 720-725 нм от глубины совершенно иной. Концентрация фототрофов начинает возрастать только с глубины 5,1 м, то есть основная часть аноксигенных фотосинтезирующих организмов сосредоточена в этом водоеме в придонной области. Максимальная величина поглощения достигается у самого дна на глубине 6 м. Также можно отметить, что абсолютные величины поглощения в спектрах вод лагуны на Зеленом мысу имеют существенно меньшие значения (величина оптической плотности пика бактериохлорофилла меньше примерно в 5 раз для максимальной концентрации микроорганизмов), чем аналогичные для озера Кисло-Сладкое. Из этого можно сделать вывод, что воды озера Кисло-Сладкое во время измерений в августе 2014 г. были богаче аноксигенными фототрофными микроорганизмами по сравнению с водами лагуны на Зеленом мысу. Однако важно помнить, что видовой состав и концентрация микроорганизмов в любом водоеме в значительной степени

зависит от множества факторов, таких как время года, колебания температуры, количество выпадающих осадков и др.

Аналогичное спектрофотометрическое исследование было проведено по всем исследуемым водоемам. Для водоемов, отделяющихся от Белого моря, были получены вертикальные профили распределения фототрофных микроорганизмов. Максимумы полученных распределений приходятся на различные глубины:

- озеро Кисло-Сладкое - 2,5 м;
- озеро Трехцветное - 2,1 м;
- озеро Нижнее Ершовское - 2 м;
- озеро Еловое - 3 м;
- лагуна на Зеленом мысу - 6 м.

Использование методов абсорбционной спектроскопии дает информацию, дополняющую анализ физико-химических параметров, и может облегчить определение видового состава и концентрации микроорганизмов, обитающих в изучаемом водоеме. Спектры поглощения могут служить полезным инструментом в комплексных исследованиях водоемов, отделяющихся от Белого моря.

Список литературы

1. Краснова Е.Д., Пантюлин А.Н. Кисло-сладкие озера, полные чудес. //Природа, 2013, № 2, с. 39-48.
2. Kharcheva A.V.; Meschankin A.V.; Lyalin I.I.; et al. The study of coastal meromictic water basins in the Kandalaksha Gulf of the White Sea by spectral and physicochemical methods //Saratov Fall Meeting 2013: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XV; and Laser Physics and Photonics XV Volume: 9031, 2014. DOI: 10.1117/12.2051737.
3. Краснова Е. Д., Пантюлин А. Н., Маторин Д. Н., Тодоренко Д. А., Белевич Т. А., Милютин И. А., Воронов Д. А. Цветение криптофитовой водоросли *Rhodomonas* sp. (Cryptophyta, Pyrenomonadaceae) в редокс зоне водоемов, отделяющихся от Белого моря. //Микробиология, 2014, т. 83, №3, с. 346–354.
4. Gorlenko V. M., Dubinina G. A., Kuznetsov S. I. "The ecology of aquatic micro-organisms".
5. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, 252 pages (1983).
6. Харчева А.В., Воронов Д.А., Воронова А.Д., Калмацкая О.А., Краснова Е.Д., и др. Флуоресценция оксигенных и аноксигенных фототрофов в нескольких реликтовых водоемах, отделяющихся от Белого моря.// «Морские исследования и образование -2014».

SPECTROPHOTOMETRIC DIAGNOSTICS OF PHOTOTROPHIC MICROORGANISMS IN DIFFERENT WATER LAYERS IN MARINE MEROMICTIC WATER BODIES AT THE WHITE SEA COAST

Kalmatskaya Olesya Alekseevna¹, Meschankin Andrey Vyacheslavovich¹, Voronov Dmitry Anatolyevich², Krasnova Elena Dmitrievna³, Laptinskiy Kirill Andreevich¹, Lyalin Igor Igorevich¹, Medvetskaya Irina Yurevna¹, Nikolskiy Kirill Sergeevich¹, Patsaeva Svetlana Viktorovna¹, Kharcheva Anastasia Vitalevna¹, Chebanova Marianna Kirillovna⁴

¹-Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Moscow

²-Institute for Information Transmission Problems of the Russian Academy of Sciences (Kharkevich Institute), Moscow,

³-Nikolay Pertsov White Sea Biological Station, Biology Department Lomonosov Moscow State University, pos.

Primorskiy, Karelia

⁴-Institute of water problems RAS, Moscow

This paper is devoted to study of water bodies separated from the White Sea by absorption spectroscopy methods. Vertical profiles of distribution of phototrophic microorganisms, that live in meromictic lakes of the White Sea were determined from absorption spectra. Also some conclusions were made about the concentration photosynthetic unicellular at different depths in each lake.

Objects of research: lakes Kislo-Sladkoe, Nignee-Ershovskoe, Trehcvetnoe, Elovoe and lagoon of Green Cape. All the objects are located in the vicinity of the MSU Nikolai Pertsov White Sea Biological Station.

- Lake Kislo-Sladkoe has a maximum depth of 4.5m, salt water flows into the lake during extremely high tides.
- Lake Trehcvetnoe has a maximum depth of 6m, the deep layers of water are salty and have a strong smell of hydrogen sulfide.
- Lake Nignee-Ershovskoe has a maximum depth of 2.5 m, water is fresh except for the bottom layers.
- Lake Elovoe has a maximum depth of 5m, the lake is freshwater to the depth of 1.5 m , then the salinity increases.
- Lagoon of the Green Cape, with its maximum depth of 6.5 m is a partly isolated water body, with a connection with Kislaya Guba, through this connection salty water flows during tides.

It is known that the explanation of different colors of the lakes' layers is the content of various bacteria and unicellular algae [1-3]. Hue and saturation of color of the layer depend on types and concentrations of living organisms at this depth. Sampling was conducted during August 2014 within the framework of students' practice of the Physics Department of Moscow State University and international conference on optics of coastal waters. Sampling was made at the maximum depth from the surface to the bottom in increments of 0.5 m and at the colored layers we reduced the increments to 0.1 m. Measurements of absorption spectra were made in the laboratory with the use of spectrophotometer HITACHI-557.

The absorption spectra maxima of different photosynthetic pigments are different. Chlorophyll algae absorb in the wavelength range from 600 nm to 700 nm, the absorption maximum of the green sulfur bacteria bacteriochlorophyll is in the range of 700-800 nm, for purple bacteria bacteriochlorophyll the peak is located in the far-red spectral range (over 800 nm) [4]. Measuring the absorption spectrum of water, it is possible to determine the dominant group of photosynthetic microorganisms.

Figure 1 shows the absorption spectra of water samples of the lake Kislo- Sladkoe (a) and the lagoon on the Green Cape (b). As the depth rises, the background intensity of absorption in the both cases increases, apparently it due to the

increase of concentration of suspended particles in water and, consequently, an increase of scattering of light on them. Starting from a certain depth the absorption spectra of water of both lakes contain a peak in the wavelength range 720-725 nm. For the Kislo-Sladkoe the depth is over 2,3 m and for the lagoon of the Green Cape - 5.1 m. This absorption band belongs to the green sulfur bacteria bacteriochlorophylls c,d,e, and indicates the presence of those microorganisms in the lower layers of the studied water bodies. This conclusion is confirmed by a strong smell of hydrogen sulfide water samples of the deep layers.

Very weak absorption bands of carotenoids and chlorophyll a, which is native for algae and cyanobacteria were present in the spectra of the optical density of water till 2 m depth in the Kislo-Sladkoe lake and till 5 m at the Green Cape lagoon. However, it is not possible to use these bands to determine the concentration of oxygen microorganisms right in the original sample of water without extraction with the use of organic solvent or it will lead to the high contribution of scattering for optical density spectra of water.

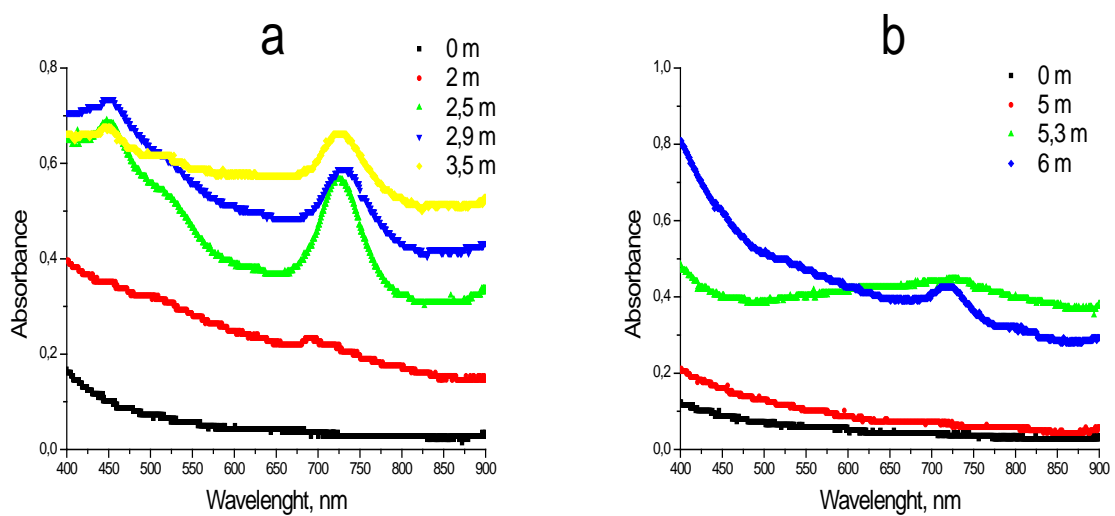


Figure 1. Absorption spectra of the studied water reservoirs at different depths: a) Kislo-Sladkoe lake (the lake of sweet-and-sour); b) lagoon on Green Cape.

By the area of the absorption band in the spectra in the wavelength range 720-725 nm it is possible to judge on the concentration of microorganisms in the water. We calculated the area of the absorption bands taking into account background due to scattering, and plotted the distribution of this quantity versus depth (the data are presented at Figure 2).

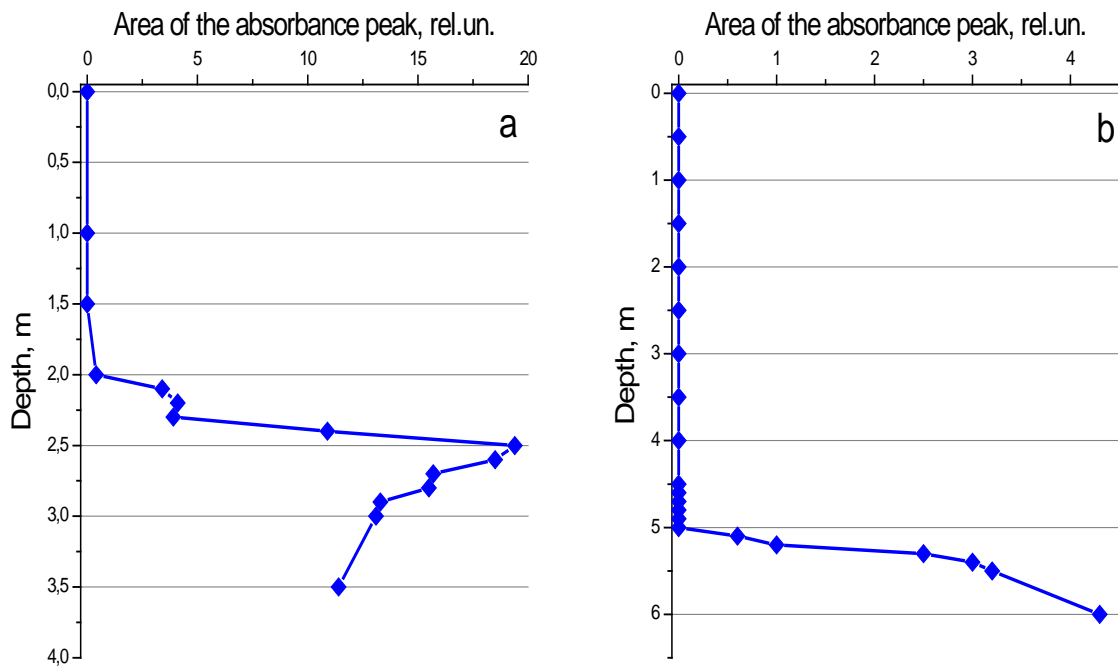


Figure 2. The dependence of the bacteriochlorophyll wavelength-integrated absorption (in rel un.) of depth: a) Kislo-Sladkoe lake (the lake of sweet-and-sour); b) lagoon on Green Cape.

From the graphs, it seems that in the lake Kislo-Sladkoe at the depth of 2.4 m begins a sharp increase of the concentration of anoxygenic photosynthetic microorganisms. All these matched our observations of samples under fluorescence microscope - large number of green colored cocci were found in the layers 2m and 2.5m deep and they seemed to be blue-green algae. In the lower layers we can observe a decrease of the amount of cyanobacteria (data from microscopy) and an increase of the sulfur bacteria (according to spectrophotometry).

The maximum concentration of anoxygenic phototrophs occurs at the depth of 2.5 m in the lake Kislo-Sladkoe, and then the number of green sulfur bacteria in water samples decreases. In the bottom layer a sufficiently high concentration of photosynthetic organisms is stored: the absorption at the depth of 3.5 m is more than half of the maximum peak.

High concentration of the sulfur bacteria at the depth 2.4-3.5m corresponds to the fluorescence spectra measurements of water with the bacteriochlorophyll from the same sample [5], however, there is no maximum of fluorescence intensity at the depth of 3.5m. This fact can be explained by a difference in physiological state or in species of sulfur bacteria in deep water layers.

In the lagoon of the Green Cape the nature of the dependence of the absorption at the wavelengths of 720-725 nm due the depth is quite different. Concentration of phototrophics begins to increase only at the depth of 5.1 m, so the main part of photosynthetic organisms is concentrated in this body of water at the bottom area. The maximum value of absorption is achieved at the bottom at a depth of 6 m. Also it should be noted that the absolute absorbance values of bacteriochlorophyll peak in water from the lagoon of the Green Cape have significantly lower values (approximately 5 times lower) than those for the lake of Kislo-Sladkoe.

From this fact, it can be concluded that the waters from lake Kislo-Sladkoe in August 2014 were richer in phototrophic microorganisms compared with the waters of the lagoon of the Green Cape. However, it is important to remember that the specific composition and concentration of microorganisms in any water body depends on many factors such as time of year, temperature fluctuations, the amount of rainfall, etc. This analysis was performed for all samples of the studied reservoirs.

Conclusions

Vertical profiles of the phototrophic microorganisms were obtained for water bodies separated from the White Sea. Maximal concentrations of organisms occurred at the following depths:

- Lake Kislo-Sladkoe - 2.5 m
- Lake Tricolor - 2.1 m
- Lake Nignee-Ershovskoe - 2 m
- Lake Elovoe - 3 m
- Lagoon on the Green Cape - 6 m

Methods of absorption spectroscopy provide information that is complementary to the analysis of physical-chemical parameters, and can facilitate the identification of the species composition and concentration of microorganisms living in the study pond. Absorption spectra can be a useful tool in studies of complex water bodies, separated from the White Sea.

References

- Краснова Е.Д., Пантюлин А.Н. Кисло-сладкие озера, полные чудес. //Природа, 2013, № 2, с. 39-48.
- Kharcheva A.V.; Meschankin A.V.; Lyalin I.I.; et al. The study of coastal meromictic water basins in the Kandalaksha Gulf of the White Sea by spectral and physicochemical methods //Saratov Fall Meeting 2013: Optical Technologies in Biophysics and Medicine Xv; and Laser Physics and Photonics XV Volume: 9031, 2014. DOI: 10.1117/12.2051737.
- Krasnova E.D., Pantyulin A.N., Matorin D.N., Todorenko D. A., Belevich G.A., I Milyutina.A., and Voronov D.A. Blooming of the Cryptomonad Alga *Rhodomonas* sp. (Cryptophyta, Pyrenomonadaceae) in the Redox Zone of the Basins Separating from the White Sea.- //Microbiology, 2014, V. 83, N 3, pp 270-277.
- Gorlenko V. M., Dubinina G. A., Kuznetsov S. I. "The ecology of aquatic micro-organisms". Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, 252 pages (1983).
- Kharcheva A.V., Voronov D.A., Voronova A.D., Kalmatskaya O.A., Krasnova E.D., et al. Fluorescence of oxygenic and anoxygenic phototrophs in several relic reservoirs, separated from the White Sea.// "Marine research and education – 2014".