

УДК 574.524;574.55;57.087.1

## СПЕКТРАЛЬНЫЕ ПИГМЕНТНЫЕ ИНДЕКСЫ ФИТОПЛАНКТОНА В РАЗНОТИПНЫХ ВОДНЫХ ОБЪЕКТАХ БЕЛАРУСИ

О. С. СМОЛЬСКАЯ<sup>1)</sup>, А. А. ЖУКОВА<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

В работе приведены результаты исследования спектров поглощения пигментов фитопланктона в разнотипных водных объектах (крупная река, малые реки и пруды рыбоводческого хозяйства). Оценены различные пигментные индексы:  $E_{450}/E_{480}$ ,  $E_{480}/E_{664}$ ,  $E_{430}/E_{664}$ ,  $E_{480}/E_{665}$ ,  $E_{664}/E_{720}$ ,  $E_{430}/E_{720}$ ,  $E_{412}/E_{720}$ ,  $E_{530}/E_{720}$ ,  $E_{430}/E_{530}$ ,  $E_{664}/E_{530}$  и  $E_{412}/E_{664}$ , которые характеризуют качество воды и физиологическое состояние фитопланктона. Измерение оптической плотности экстракта проводили в диапазоне 350 нм – 800 нм с шагом 1 нм, в качестве растворителя использовали 90 % ацетон. Показано, что проба воды подходит для расчета пигментных индексов и содержания хлорофиллов, если спектр имеет четко выраженные максимумы поглощения, расположенные в красной и синей областях спектра около 663–665 нм и 430 нм. Установлено, что нет статистически значимой разницы между светопоглощением на длинах волн 720 нм и 750 нм, что позволяет прописывать более короткий участок спектра без потери значимой информации.

**Ключевые слова:** пигментные индексы; хлорофилл; феопигменты; фотосинтез; спектр поглощения; длина волны; водные объекты.

## SPECTRAL PIGMENT INDICES OF PHYTOPLANKTON IN DIFFERENT WATER OBJECTS OF BELARUS

O. S. SMOLSKAYA<sup>a</sup>, H. A. ZHUKAVA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Belarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Belarus

Corresponding author: [sylimova\\_1991@mail.ru](mailto:sylimova_1991@mail.ru)

The paper presents the results of studying the absorption spectra of phytoplankton pigments in various types of objects, such as the large river, small rivers and fish farm ponds). Different pigment indices  $E_{450}/E_{480}$ ,  $E_{480}/E_{664}$ ,  $E_{430}/E_{664}$ ,  $E_{480}/E_{665}$ ,  $E_{664}/E_{720}$ ,  $E_{430}/E_{720}$ ,  $E_{412}/E_{720}$ ,  $E_{530}/E_{720}$ ,  $E_{430}/E_{530}$ ,  $E_{664}/E_{530}$ ,  $E_{412}/E_{664}$  are estimated that characterize the water quality and physiological state of phytoplankton. The optical density of the extract was measured in the range of 350 nm to 800 nm in 1 nm steps, 90 % acetone was used as the solvent. It is shown that the water sample is suitable for the calculation of pigment indices and chlorophyll content if the spectrum has clearly expressed absorption maxima located in the red and blue regions of the spectrum at about 663–665 nm and 430 nm. It was found that there is no statistically significant difference between light absorption at 720 nm and 750 nm, which allows a shorter portion of the spectrum to be recorded without loss of relevant information.

**Key words:** pigment indices, chlorophyll, photo pigments, photosynthesis, absorption spectrum, wavelength, water objects.

### Образец цитирования:

Смольская О. С., Жукова А. А. Спектральные пигментные индексы фитопланктона в разнотипных водных объектах Беларуси // Журн. Белорус. гос. ун-та. Экология. 2018. № 1. С. 114–123.

### For citation:

Smolskaya O. S., Zhukava H. A. Spectral pigment indices of phytoplankton in different water objects of Belarus. *J. Belarus. State Univ. Ecol.* 2018. No. 1. P. 114–123 (in Russ.).

### Авторы:

**Ольга Сергеевна Смольская** – ассистент кафедры зоологии; аспирант кафедры общей экологии и методики преподавания биологии.

**Анна Анатольевна Жукова** – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры общей экологии и методики преподавания биологии.

### Authors:

**Volha S. Smolskaya**, assistant of the department of zoology, biology faculty; graduate student of the department of general ecology and methods of biology teaching.

[sylimova\\_1991@mail.ru](mailto:sylimova_1991@mail.ru)

**Hanna A. Zhukava**, PhD (biology), associate professor; associate professor of the department of general ecology and methods of biology teaching.

[anna\\_eco@tut.by](mailto:anna_eco@tut.by)

## Введение

Важное значение в функционировании водоемов различного типа принадлежит фитопланктону, который в процессе фотосинтеза создает органические вещества, составляющие энергетическую основу метаболических процессов в пресноводных экосистемах. Фитопланктон, в сравнении с другими автотрофными сообществами, дает наиболее быстрый отклик на изменение среды обитания, именно поэтому среди факторов формирования качества водной среды зачастую центральное место принадлежит фитопланктону как ключевому элементу первичного звена трофической цепи [1].

На протяжении последних лет во многих водных объектах можно отметить ухудшение качества воды и снижение продуктивности промысловых видов гидробионтов. Недостаточная изученность структурно-функциональной организации водных экосистем приводит к тому, что не всегда возможно выявить причины и механизмы изменений. Для оценки продуктивности водных объектов используют интегральные показатели, к которым среди прочих относят хлорофилл и другие растительные пигменты. Растительные пигменты – показатели структуры растительных сообществ. Их можно применять как маркеры физиологического состояния растительных организмов и функционирования экосистем в целом. Однако их пространственно-временное распределение в различных компонентах экосистемы изучено недостаточно [2; 3].

Для гидробиологических исследований остается актуальным поиск быстрых и информативных показателей оценки экологического состояния водных объектов. Одним из ключевых элементов такой оценки является содержание хлорофилла. Этот подход положен в основу шкал, разработанных для оценки трофического статуса водоемов и качества воды. Дополнить информацию о состоянии планктонных продуцентов также могут пигментные характеристики фитопланктона [3].

Хлорофилл *a* является основным пигментом цианобактерий и одноклеточных водорослей, которые составляют основу фитопланктона. Из нескольких десятков пигментов, содержащихся в фотосинтетическом аппарате водорослей, хлорофиллу *a* отведена важнейшая роль в процессе фотосинтеза. Содержание хлорофилла *a* считается универсальным эколого-физиологическим показателем. Информация о концентрации хлорофилла *a* и ее изменчивости в водном объекте служит критерием при оценке запасов биомассы фитопланктона и его продукции, а также индикатором загрязнения вод. Соотношение между концентрацией хлорофилла *a* и продуктами его превращений, а также другими пигментами (хлорофилл *b*, хлорофилл *c*<sub>1</sub> + *c*<sub>2</sub>, каротиноиды) характеризуют физиологическое состояние водорослей [4].

Изменение пигментных характеристик сопряжено как с уровнем трофии и обилием, так и со структурой фитопланктона. Она происходит взаимосвязано и сохраняет свою направленность в ходе сезонной и многолетней сукцессии сообщества, чутко реагирует на условия внешней среды и соответствует особенностям экологического состояния водоема [5].

В последнее время предпринимаются попытки по характеру спектра поглощения света пигментами определять некоторые важные структурные показатели фитопланктона. В частности, в коротковолновой области спектра поглощения установлено отличие цианопрокариот (синезеленых водорослей) от других групп, и на этой основе разработан способ оценки качества воды по пигментному индексу  $E_{450}/E_{480}$  [3].

Для оценки содержания каротиноидов в водных сообществах также может быть использован индекс  $E_{480}/E_{665}$  [3], однако он применялся лишь для нескольких водных объектов и не всегда показывал наличие связи со структурными параметрами сообщества. Для более корректной оценки содержания каротиноидов в водных сообществах недавно был предложен скорректированный индекс  $E_{480}/1.7E_{665k}$ , учитывающий долю феопигментов в суммарном светопоглощении, однако в настоящее время апробация этого индекса также проведена лишь в единичных работах российских авторов [3; 6]. Определение спектра поглощения пигментов и последующий расчет индексов в разнотипных водных объектах Беларуси (большие и малые реки, озера, пруды) ранее не проводили [7].

Следует отметить, что комплексные исследования структуры фитопланктона и спектральных характеристик фотосинтетических пигментов в литературе крайне немногочисленны [8]. Также в мировой практике невыясненным остается вопрос о пороговой чувствительности спектрального подхода для характеристики структурных показателей фитопланктона и возможностях его использования для водных экосистем разного уровня трофии.

Цель данного исследования – изучение спектральных пигментных индексов для разнотипных водных экосистем Беларуси, обобщение данных, собранных в течение вегетационного периода 2012 и 2015 гг. в водоемах различного трофического статуса.

## Материалы и методы исследования

Исследования проводили на водоемах различного трофического уровня и в разные периоды вегетационного сезона. Были обследованы крупная р. Вилия (длина 498 км, из них в Беларуси 264 км) и малые реки (Уша, Смердия, Цна), длиной менее 100 км, расположенные на северо-западе Беларуси и относящиеся к бассейну Балтийского моря [9]. Исследования также проводили на прудах рыбоводческого хозяйства «Вилейка» и связанных с ними реках. Пруды рыбхоза «Вилейка» заполняются весной водой из р. Смердия (правый приток р. Вилия) или, при недостатке воды в реке, водой из р. Вилия. Сброс воды осуществляется в р. Смердия, русло которой практически на всем протяжении канализовано, и далее в р. Вилия. Пробы отбирали на 10 прудах рыбхоза: пруды 21–28 площадью 0,24 га, пруд 3–5 площадью 0,5 га и пруд 3–6 площадью 0,6 га.

Воду отбирали в чистые сосуды с глубины 0,25–0,5 м от поверхности воды и не менее 10–15 см от дна, не допуская взмучивания грунта. Перед взятием проб сосуд два-три раза ополаскивали водой из исследуемого водоема. В 2012 г. пробы воды отбирали в осенний период в реках (собрано 13 проб), отбор проб в 2015 г. проводили в весенне-летний период на прудах рыбоводческого хозяйства «Вилейка» и связанных с ними реках (отобрано 19 проб). В ходе работы в собранных пробах воды были определены спектры поглощения пигментов в ацетоновых экстрактах и рассчитаны пигментные индексы.

После отбора пробы и ее доставки в лабораторию незамедлительно приступали к обработке. Взвешенные в воде вещества осаждали на ядерные фильтры с диаметром пор 1 мкм под вакуумом (до  $-0,4$  атм). Затем фильтры переносили в пробирки, залив небольшим слоем 90 %-ного ацетона для последующего определения содержания хлорофилла и считывания спектров поглощения пигментов. Для более полного экстрагирования пигментов пробы на фильтре выдерживали в темном прохладном месте 8–24 ч, а затем тщательно растирали [10]. Полученный экстракт очищали, профильтровывая через мембранный фильтр, диаметр пор которого 0,2 мкм. Очищенный экстракт переносили в стеклянные мерные пробирки, которые либо обрабатывали сразу, либо в течение нескольких часов до проведения анализа хранили закрытыми притертыми пробками в прохладном защищенном от света месте.

Измерение оптической плотности (или пропускания) экстракта на различных длинах волн проводили в диапазоне 350–800 нм с шагом 1 нм в исходных ацетоновых экстрактах и в пробах, подкисленных несколькими каплями 0,01 N соляной кислоты (где хлорофиллы переходят в феопигменты), при этом использовали кювету, длина которой 2 см. Работу проводили на спектрофотометре *Cary 50* [5; 11].

Сканирование спектров поглощения экстрактов проводили с помощью приложения *Scan* на интервале длин волн 300–800 нм с последующим сравнением полученных участков спектров. Рассчитанные значения индексов использовали для анализа возможности применения спектрального подхода в исследованных водных объектах.

При статистической обработке данных использовали программные пакеты *Microsoft Excel* и *Statistica 8.0*.

## Результаты исследования и их обсуждение

Для экстракции фотосинтетических пигментов фитопланктона (хлорофилла *a*, хлорофилла *b*, каротиноидов) в методиках используют растворители различной химической природы: 90 и 80 %-ный ацетон, 100 %-ный этанол или метанол, диэтиловый эфир, диметилсульфоксид. Выбор растворителя зависит от поставленной задачи и ограничений по применению (метанол не рекомендуется применять при наличии в экстракте феофетинов). Однако мы не всегда можем знать точный состав фотосинтетических пигментов, так как отбор проб происходит с различных водоемов и в различное время года, и точную химическую природу биомолекул, что также ограничивает выбор растворителя. Наиболее часто для извлечения каротиноидов применяется ацетон, хотя лучшим экстрагентом считается метанол, который редко используется ввиду его высокой токсичности. Наилучшим экстрагентом для всех хлорофиллов является диэтиловый эфир. Исходя из цели нашей работы, мы в своем исследовании используем 90 %-ный ацетон, принятый в качестве растворителя во многих методиках [12; 13].

Согласно стандартной методике спектрофотометрического определения хлорофилла, отсчеты оптических плотностей для расчета концентрации хлорофиллов берутся на четырех длинах волн – 664, 647, 630 и 750 нм [11]. Фотометрирование проводится дважды: до и после подкисления экстракта несколькими каплями 0,1 N раствора соляной кислоты в ацетоне. Оптические свойства хлорофилла в ацетоновом экстракте изменяются по сравнению с его нативной формой. Эти изменения связаны с нарушением целостности хлорофилл-белково-липоидного комплекса тилакоидов. Отделенный от хлоропласта и протеина мембран при экстрагировании хлорофилл *a* характеризуется двумя максимумами поглощения, расположенными в красной и синей областях спектра около 663–665 и 430 нм. У дополнительных хлорофиллов пики несколько смещены в адсорбционном окне: у хлорофилла *b*

они соответствуют длинам волн 643 и 435 нм, у хлорофилла *c* – 630 нм. Одновременно методикой допускается определять концентрации и других пигментов: феофитина *a*, суммарную концентрацию каротиноидов. С этой целью необходимо до подкисления экстракта дополнительно взять отсчеты еще на двух длинах волн – 430 нм и 480 нм [4].

Каротиноиды – вспомогательные фотосинтетические пигменты – поглощают коротковолновые лучи спектра (синие, фиолетовые и ультрафиолетовые) и передают поглощенную энергию хлорофиллу. У некоторых растений (синезеленые и красные водоросли) имеются дополнительные пигменты иной химической природы, чем каротиноиды, но также поглощающие свет и передающие поглощенную энергию хлорофиллу. Это так называемые фикобилины (синий фикоциан и красный фикоэритрин).

Фотосинтетические пигменты микроорганизмов характеризуются по спектрам поглощения света, при этом состав фотосинтетических пигментов зависит от систематической принадлежности водорослей. Выделяют четыре типа хлорофилл-белковых комплексов [2], содержащих соответственно хлорофилл-*a*, хлорофилл-*a/c*, хлорофилл-*a/b*, хлорофилл-*a/d*, подразделяя их на шесть групп в зависимости от присутствия фукоксантина или фикобилинов (табл. 1).

Таблица 1

Состав пигментов у основных групп водорослей [2]

Table 1

The pigment composition of the main algae groups [2]

Отделы водорослей	Состав пигментов
Зеленые, харовые, эвгленовые	Хлорофилл- <i>a/b</i>
Желтозеленые, радиодифитовые	Хлорофилл- <i>a/c</i>
Диатомовые, динофитовые, золотистые, бурые	Хлорофилл- <i>a/c</i> +фукоксантин
Криптофитовые	Хлорофилл- <i>a/c</i> +фикобилины
Красные	Хлорофилл- <i>a/d</i> +фикобилины
Синезеленые	Хлорофилл- <i>a</i> +фикобилины

В экстракте из осажденной на фильтр взвеси природной воды находятся пигменты, имеющие перекрывающиеся спектры поглощения света, поэтому оценка их концентраций усложняется. Так, для расчета содержания хлорофиллов *a*, *b* и *c* решается система трех уравнений с тремя неизвестными. При этом учитывается поглощение света каждым пигментом на длинах волн (664, 647, 630 нм), соответствующих их спектральным максимумам. Известно несколько вариантов таких уравнений, отличающихся использованием различных удельных коэффициентов экстинкции. В гидробиологических исследованиях обычно используются уравнения Джеффри и Хамфри, основанные на уточненных применительно к хлорофиллам водорослей значениях этих коэффициентов [14].

Отметим, что в первую очередь при приготовлении экстракта пигментов необходимо убедиться в отсутствии неспецифического поглощения света, возникающего за счет взвесей и растворимых окрашенных соединений, среди которых могут быть и дериваты некоторых пигментов, как, например, фукоксантина [14]. Это поглощение контролируется измерением оптической плотности в крайней длинноволновой области видимого спектра, обычно на длине волны 750 нм. При вычислении концентраций пигментов рекомендуется из показаний прибора на всех длинах волн вычитать единую поправку на неспецифическое поглощение, равную оптической плотности, измеренной на длине волны 750 нм. Одной из причин этого может быть нарушение пропорциональности между поглощением света и концентрацией пигментов при значительной мутности раствора. Неспецифическое поглощение за счет взвешенных частиц можно уменьшить путем отстаивания экстракта в холодильнике, повторным центрифугированием, добавлением нескольких капель чистого растворителя (аcetона).

Соблюдая все вышеуказанные условия получения экстрактов, проведено их последующее сканирование с помощью спектрофотометра Cary 50. В результате были измерены спектры поглощения, типичный вид которых показан на рис. 1. Таким образом, мы можем наблюдать четкие максимумы спектров поглощения в красной и синей области. Спектры прописываются разборчиво, никаких выбросов, а соответственно, и мешающих примесей мы не наблюдаем.

Однако такая ситуация бывает не всегда, что дает нам основание «браковать» пробу, непригодную для детального анализа спектра (рис. 2). Это может происходить, когда методика при отборе пробы была нарушена или когда проба очень бледная, с низким содержанием в ней пигментов. Следовательно,

мы считаем важным прописывать спектры поглощения проб еще до определения содержания хлорофиллов и феопигментов, а также расчета пигментных индексов, что поможет нам в дальнейшем быть уверенными в результате.

е

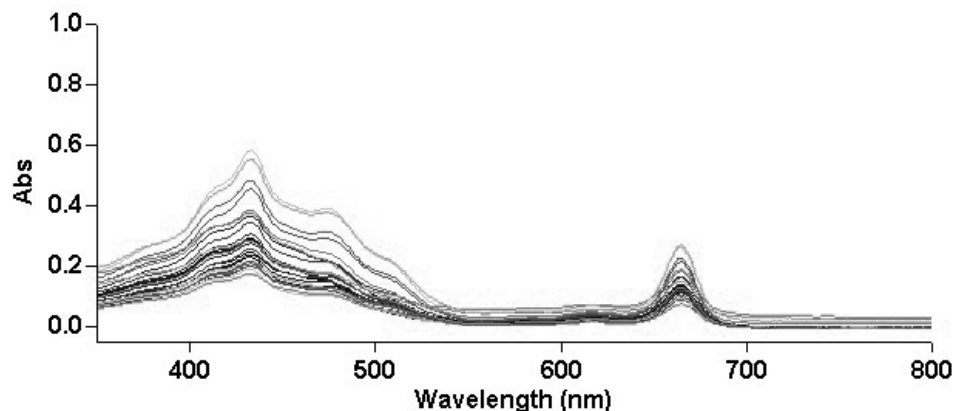


Рис. 1. Спектры поглощения пигментов планктона, измеренные в диапазоне длин волн 350–800 нм

Fig. 1. The absorption spectra of plankton pigments measured in the wavelength range 350–800 nm

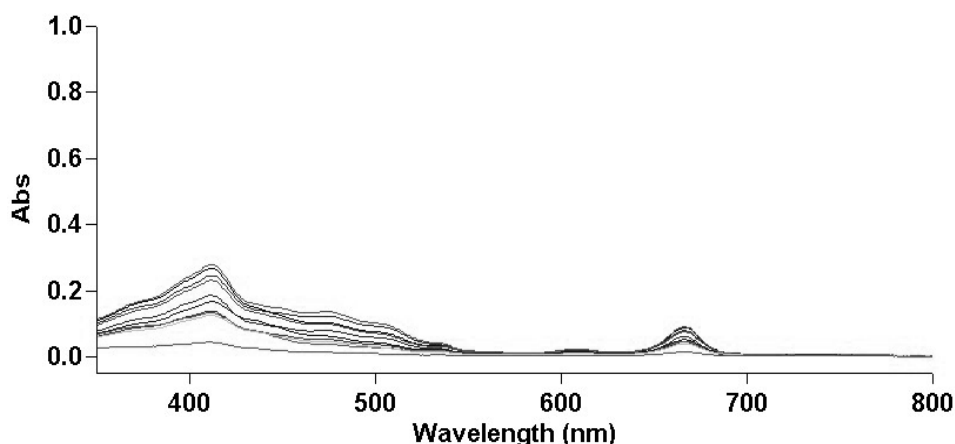


Рис. 2. Спектры поглощения плохо прописанных спектров поглощения проб планктона в диапазоне длин волн 350–800 нм

Fig. 2. The absorption spectra of poorly recorded absorption spectra of plankton samples in the wavelength range 350–800 nm

Еще одно уточнение метода расчета спектральных индексов, которое мы хотим предложить: нет необходимости снимать спектр до 750 нм (что описано выше), к 700 нм линия спектра выходит на плато и в целях экономии времени, затрачиваемого на обработку одной пробы, достаточно проводить измерения до 720 нм. Этот вывод апробирован результатами анализа многолетних исследований, когда не наблюдалось различий в спектральных данных на длинах волн 750 и 720 нм, относящихся к различным водоемам и собранных в разные временные промежутки. При сканировании спектра поглощения изначально мы получаем большой массив данных, причем для каждой пробы в трех повторностях. Для дальнейшего расчета индексов эти данные подвергаются «ручной» обработке, хотя этот процесс достаточно трудоемкий, поскольку отнимает много времени. Обрезая исходный спектр до длины 720 нм, мы уменьшим и время обработки, и количество исходных значений в спектральной базе данных. Именно с этой целью проведен нами статистический анализ данных разных проб, чтобы подтвердить предположение об отсутствии попарных различий в значениях спектра на длинах волн 720 и 750 нм для исследованных проб.

В первую очередь мы сформировали 2 парных массива данных по светопоглощению на длинах волн 720 нм и 750 нм в пробах и сравнили их. Важным условием выбора метода анализа данных является проверка нормальности распределения анализируемых признаков, так как применение параметрических методов к данным, не подчиняющимся закону нормального распределения, может привести к выводам, не соответствующим действительности. Во избежание указанной ошибки, вначале нами выполнена проверка на нормальность распределения светопоглощения в двух сравниваемых

массивах данных в программе *Statistica 8.0*. При проверке нормальности распределения анализируемых данных использовали *W*-тест Шапиро–Уилка (*Shapiro-Wilk's W test*), проверяющий нулевую гипотезу об отсутствии различий между наблюдаемым распределением признака и теоретическим ожидаемым его нормальным распределением. В результате выполнения теста получаем значение вероятности справедливости нулевой гипотезы (*P*). При  $P > 0,05$  можно заключить, что анализируемое распределение не отличается от нормального [15].

В случае с полученными нами массивами данных как с длиной волны 750 нм, так и с длиной волны 720 нм, тест Шапиро–Уилка дает значение  $P < 0,00001$  (рис. 3 а, б), что указывает на асимметричность распределения данных. Основная часть данных была близка к нулевым значениям, что указывает на очень низкое светопоглощение в этой области спектра и отсутствие примесей, мешающих процессу снятия спектра фотосинтетических пигментов.

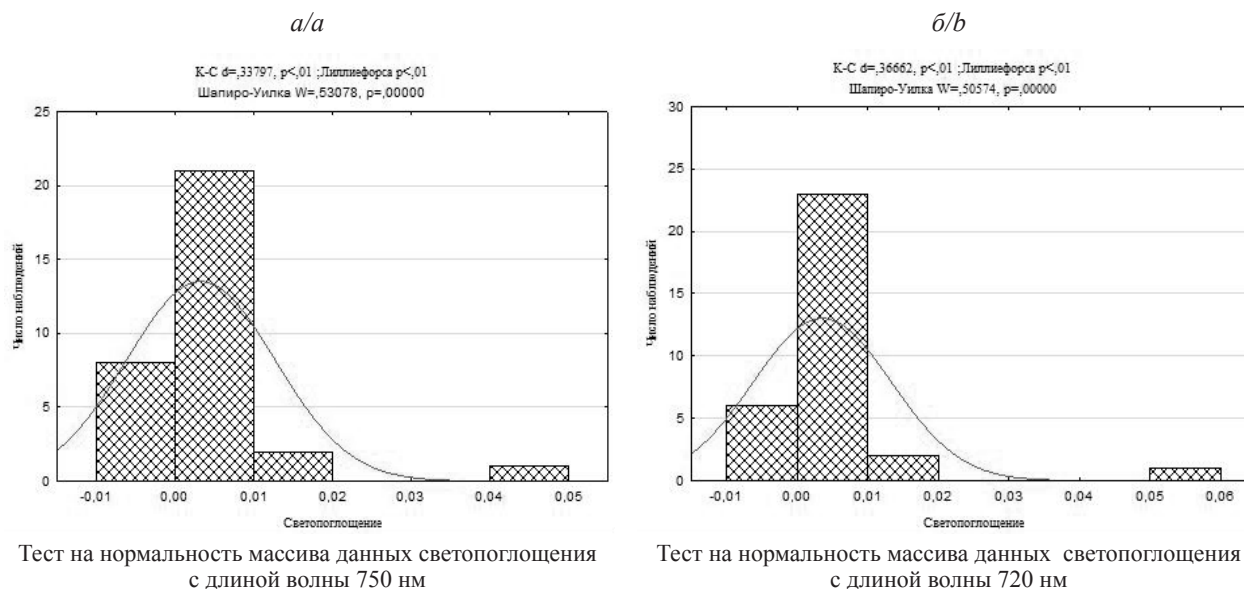


Рис. 3. Результат проверки нормальности распределения данных светопоглощения на длинах волн 750 и 720 нм, выполненной при помощи модуля *Descriptive Statistics (Statistica 8.0)*

Fig. 3. The result of the verification of the normal distribution of the light absorption data at 750 and 720 nm wavelengths, made using the *Descriptive Statistics module (Statistica 8.0)*

Исходя из полученных результатов проверки на нормальность, мы провели сравнение двух групп значений светопоглощения (при длинах волн 720 и 750 нм) с помощью *U*-теста Манна–Уитни (*Mann–Whitney Utest*), который является непараметрическим тестом. Он проверяет гипотезу, согласно которой обе исследованные группы происходят из одной генеральной совокупности и наблюдаемые различия между средними значениями сравниваемых выборок случайны. На рис. 4 представлен результат проведенного теста.

U критерий Манна-Уитни (Таблица по сравнению)										
По перем. Длина волны										
Отмеченные критерии значимы на уровне $p < ,05000$										
	Сум. ранг Группа 1	Сум. ранг Группа 2	U	Z	p-уров.	Z с корр.	p-уров.	N Группа 1	N Группа 2	2-х стор точное p
светопоглощение	1020,000	1060,000	492,0000	-0,261830	0,793453	-0,263585	0,792100	32	32	0,794852

Рис. 4. Результаты выполнения теста Манна–Уитни для двух сравниваемых массивов

Fig. 4. The results of the Mann–Whitney test for two compared arrays

Тест указывает на очень высокую вероятность справедливости исходной гипотезы об отсутствии различий ( $P = 0,79$ ), и мы можем сделать вывод об отсутствии статистически значимой разницы между массивами с длинами волн 750 и 720 нм. Следовательно, наше предположение подтвердилось и можно снимать более короткий участок спектра поглощения экстракта пигментов – до 720 нм.

Нами продолжен анализ спектров и проведена оценка поглощения света на ключевых участках исследованного диапазона длин волн в ацетоновых экстрактах. При обработке проб было обнаружено,

что спектры поглощения хлорофилла в ацетоновых экстрактах изменяются в зависимости от содержания феопигментов в пробе и видового состава фитопланктона, более выраженные различия фиксируются в синей области спектра. В качестве примера на рис. 5 приведены спектры поглощения проб с разным видовым составом фитопланктона. Отношения оптических плотностей экстрактов на разных длинах волн спектра поглощения, косвенно отражающие соотношения концентраций пигментов, по данным литературы, могут служить показателями физиологического состояния, структуры и таксономического разнообразия фитопланктонного сообщества.

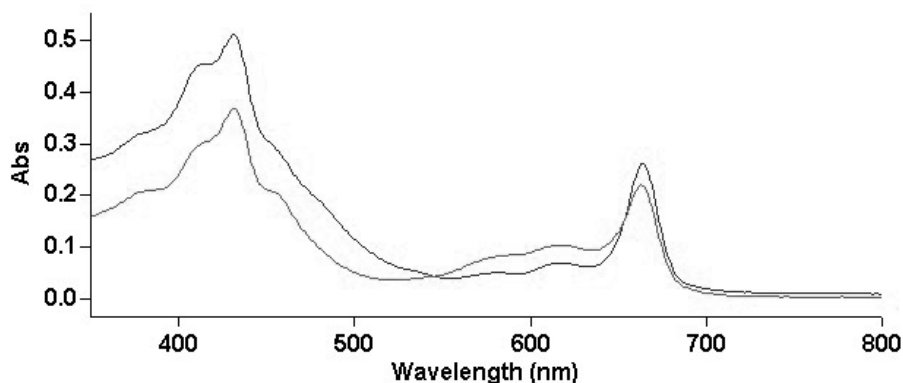


Рис. 5. Спектры поглощения проб с разным видовым составом фитопланктона

Fig. 5. The spectra of absorption of samples with different species composition of phytoplankton

Исходя из полученных данных и анализа литературных источников [3; 16; 17], перспективными для получения информации о состоянии фитопланктона определены пигментные индексы  $E_{480}/E_{664}$ ,  $E_{450}/E_{480}$ ,  $E_{430}/E_{664}$ . Данные пигментные индексы рассчитываются исходя из оптических плотностей ацетонового экстракта пигментов в областях длинно- и коротковолнового максимумов поглощения света хлорофиллом-*a* (664 и 430 нм) и коротковолновых максимумов для каротиноидов (430, 450, 480 нм).

Проанализировав литературные источники, можно отметить, что пигментные индексы достаточно редко используются как маркеры состояния фитопланктона и качества воды. Мы попытались проанализировать имеющиеся данные и рассчитать пигментные индексы для исследованных нами разных групп водоемов.

К существующим в литературе пигментным индексам мы также предлагаем добавить новые, которые используются с целью контроля чистоты экстракта пигментов и правильности прописывания спектра. Таким образом, предлагаем ввести дополнительные числовые параметры контроля спектра для того, чтобы быть уверенными в правильности и точности расчета индексов и возможности использования их в качестве показателя состояния фитопланктона и водной экосистемы в целом. Данные, полученные по имеющимся в литературе пигментным индексам, представлены в табл. 2, а в табл. 3 отражены предлагаемые нами индексы контроля чистоты экстракта.

Таблица 2

**Пигментные индексы фитопланктона для различных водоемов**

Table 2

**The pigment indices of phytoplankton for various water objects**

Водный объект	Дата	Индексы			
		$E_{450}/E_{480}$	$E_{480}/E_{664}$	$E_{430}/E_{664}$	$E_{480}/E_{665}$
Вилейка, пруд 22	02.04.2015	2,212	0,754	2,348	0,765
Вилейка, пруд 23	02.04.2015	1,917	0,738	2,123	0,738
Вилейка, пруд 27	02.04.2015	1,727	0,873	2,143	0,873
Вилейка, пруд 25	02.04.2015	1,657	0,875	2,013	0,875
Вилейка, пруд 26	02.04.2015	1,778	0,857	2,127	0,857

Водный объект	Дата	Индексы			
		$E_{450}/E_{480}$	$E_{480}/E_{664}$	$E_{430}/E_{664}$	$E_{480}/E_{665}$
Вилейка, пруд 21	13.05.2015	1,561	0,868	1,895	0,868
Вилейка, пруд 22	13.05.2015	1,594	0,894	1,982	0,894
Вилейка, пруд 23	13.05.2015	1,590	0,891	2,015	0,891
Вилейка, пруд 24	13.05.2015	1,605	0,899	2,000	0,899
Вилейка, пруд 25	13.05.2015	1,459	1,088	2,118	1,088
Вилейка, пруд 26	13.05.2015	1,544	0,968	2,032	0,978
Вилейка, пруд 27	13.05.2015	1,580	0,945	2,082	0,945
Вилейка, пруд 28	13.05.2015	1,677	0,805	1,987	0,805
Вилейка, пруд 3-5	13.05.2015	1,530	0,910	1,975	0,915
Вилейка, пруд 3-6	13.05.2015	1,654	0,773	1,883	0,776
Вилейка, пруд 21	03.06.2015	1,653	0,824	1,945	0,824
Вилейка, пруд 22	03.06.2015	1,510	0,944	1,981	0,927
Вилейка, пруд 23	03.06.2015	1,528	1,029	2,171	1,029
Вилейка, пруд 24	03.06.2015	1,295	1,070	1,842	1,052
р. Смердия, до р/х Вилейка	12.11.2012	1,712	0,793	2,031	0,818
р. Смердия, сброс р-за «Вилейка»	12.11.2012	1,363	1,157	1,982	1,158
р. Смердия, 500 м ниже сброса р-за «Вилейка»	12.11.2012	1,544	1,132	2,354	1,141
р. Смердия, перед впадением в р. Виляя	12.11.2012	1,544	1,102	2,283	1,097
р. Виляя, насосная станция	12.11.2012	1,446	1,044	2,215	1,026
р. Виляя, после Смердии	12.11.2012	1,454	0,991	2,172	1,000
р. Цна, водопадающий канал	12.11.2012	1,173	1,171	2,332	0,750
р. Уша, основной сброс	12.11.2012	1,616	0,964	2,182	0,952
р. Уша, до сброса	12.11.2012	1,891	0,932	2,564	0,957
р. Уша, 1 км после сброса	12.11.2012	2,142	0,768	2,671	0,774
р. Виляя, 1 км после р. Уша	12.11.2012	1,842	0,733	2,180	0,730
р. Виляя, за г. Сморгонь	12.11.2012	2,033	0,677	2,300	0,750
р. Виляя, у д. Стешицы	12.11.2012	1,379	0,972	1,700	0,968

Таблица 3

Индексы контроля чистоты экстракта

Table 3

The pigment indexes of purity control of extract

Водный объект	Индексы контроля чистоты экстракта						
	$E_{664}/E_{720}$	$E_{430}/E_{720}$	$E_{412}/E_{720}$	$E_{530}/E_{720}$	$E_{430}/E_{530}$	$E_{664}/E_{530}$	$E_{412}/E_{664}$
Вилейка, пруд 22	69,000	162,000	160,000	11,000	14,727	6,273	2,319
Вилейка, пруд 23	65,000	138,000	142,000	11,000	12,545	5,909	2,185
Вилейка, пруд 27	63,000	135,000	146,000	11,000	12,273	5,727	2,317
Вилейка, пруд 25	10,000	20,125	21,500	2,750	7,318	3,636	2,150
Вилейка, пруд 26	63,000	134,000	150,000	11,000	12,182	5,727	2,381
Вилейка, пруд 21	76,000	144,000	165,000	16,000	9,000	4,750	2,171
Вилейка, пруд 22	14,125	28,000	31,500	3,375	8,296	4,185	2,230



Водный объект	Индексы контроля чистоты экстракта						
	$E_{664}/E_{720}$	$E_{430}/E_{720}$	$E_{412}/E_{720}$	$E_{530}/E_{720}$	$E_{430}/E_{530}$	$E_{664}/E_{530}$	$E_{412}/E_{664}$
Вилейка, пруд 23	45,667	92,000	100,333	9,000	10,222	5,074	2,197
Вилейка, пруд 24	138,000	276,000	306,000	27,000	10,222	5,111	2,217
Вилейка, пруд 25	68,000	144,000	153,000	15,000	9,600	4,533	2,250
Вилейка, пруд 26	93,000	189,000	205,000	18,000	10,500	5,167	2,204
Вилейка, пруд 27	36,500	76,000	80,500	8,000	9,500	4,563	2,205
Вилейка, пруд 28	77,000	153,000	167,000	13,000	11,769	5,923	2,169
Вилейка, пруд 3-5	201,000	397,000	414,000	35,000	11,343	5,743	2,060
Вилейка, пруд 3-6	123,500	232,500	237,000	18,500	12,568	6,676	1,919
Вилейка, пруд 21	91,000	177,000	168,000	15,000	11,800	6,067	1,846
Вилейка, пруд 22	54,000	107,000	109,000	10,000	10,700	5,400	2,019
Вилейка, пруд 23	17,500	38,000	37,000	4,500	8,444	3,889	2,114
Вилейка, пруд 24	3,563	6,563	5,938	1,625	4,038	2,192	1,667
р. Смердия, до р/х Вилейка	11,250	21,750	22,000	4,250	5,118	2,647	1,956
р. Смердия, сброс р-за «Вилейка»	2,762	5,384	5,377	1,490	3,613	1,853	1,947
р. Смердия, 500 м ниже сброса р-за «Вилейка»	59,250	138,750	138,000	10,500	13,214	5,643	2,329
р. Смердия, перед впадением в р. Виля	34,800	79,800	77,600	7,600	10,500	4,579	2,230
р. Виля, насосная станция	8,333	18,667	17,444	3,111	6,000	2,679	2,093
р. Виля, после Смердии	18,750	40,500	38,000	5,250	7,714	3,571	2,027
р. Цна, водопадающий канал	2,600	1,800	2,000	1,600	1,125	1,375	3,333
р. Уша, основной сброс	70,000	152,000	143,333	8,333	18,240	8,400	2,048
р. Уша, до сброса	48,000	120,000	136,000	11,000	10,909	4,364	2,833
р. Уша, 1 км после сброса	3,300	8,400	7,500	0,600	14,000	5,500	2,273
р. Виля, 1 км после р. Уша	5,571	12,000	11,000	0,429	28,000	13,000	1,974
р. Виля, за г. Сморгонь	3,429	8,143	7,571	0,857	9,500	4,000	2,208
р. Виля, у д. Стешницы	2,100	3,550	3,450	1,317	2,696	1,595	1,643

Как следует из табл. 2 и 3, мы сравнили 4 имеющихся в литературе индекса [3; 6; 16; 17], а также 7 предложенных нами дополнительных. Так индексы, взятые из литературы –  $E_{450}/E_{480}$ ,  $E_{480}/E_{664}$ ,  $E_{430}/E_{664}$ ,  $E_{480}/E_{665}$  – в нашей работе изменялись в пределах от 0,6 до 2,5. Индексы контроля чистоты экстракта  $E_{664}/E_{720}$ ,  $E_{430}/E_{720}$ ,  $E_{412}/E_{720}$  имеют больший размах значений – от 1 до 260; пигментные индексы  $E_{530}/E_{720}$ ,  $E_{430}/E_{530}$  имеют диапазон от 0,5 до 30, а индексы  $E_{664}/E_{530}$ ,  $E_{412}/E_{664}$  – от 1 до 6. Диапазон изменения дополнительных индексов варьирует в широких пределах, однако выделяются пороговые значения, по которым можно судить о пригодности спектра для расчета индексов, отражающих состояние пигментного состава планктона. Таким образом, для каждого конкретного индекса существует нижний пороговый предел:  $E_{412}/E_{664} - 1,5$ ;  $E_{664}/E_{530} - 1,5$ ;  $E_{430}/E_{530} - 2,5$ ;  $E_{530}/E_{720} - 1$ ;  $E_{664}/E_{720}$ ,  $E_{430}/E_{720}$ ,  $E_{412}/E_{720} - 5$ . Исходя из вышесказанного, мы предлагаем индексы  $E_{412}/E_{664}$ ,  $E_{664}/E_{530}$ ,  $E_{430}/E_{530}$  рассматривать в качестве информативных, а индексы  $E_{530}/E_{720}$ ,  $E_{664}/E_{720}$ ,  $E_{430}/E_{720}$ ,  $E_{412}/E_{720}$  – как вспомогательные.

Необходимо отметить, что индексы могут быть рассчитаны для всех типов водоемов, но есть отличия, что подтверждается нашими данными. Так, увеличение индекса  $E_{430}/E_{664}$  свидетельствует об увеличении относительного вклада каротиноидов в светопоглощение и, соответственно, ухудшении физиологического состояния фитопланктона. Предпосылкой для введения индекса  $E_{412}/E_{664}$  стал анализ спектров поглощения. Мы обратили внимание на то, что в исследуемых пробах максимальные значения в синей области спектра наблюдаются не на длине волны 430 нм, а линия спектра достигает предела на длине 412 нм. Сравнив эти индексы, можно сделать вывод: индекс  $E_{412}/E_{664}$  для прудов рыбоводческого хозяйства «Вилейка» является более высоким, а для рек, наоборот, индекс  $E_{430}/E_{664}$  дает большее значение. Соответственно, существует разница в пигментном составе в зависимости от того, какие водные объекты исследуются. Индекс  $E_{450}/E_{480}$ , характеризующий долю цианопрокариот в фитопланктоне, во всех исследуемых пробах был выше 1, что свидетельствует о доминантном содержании в пробах диатомовых и зеленых водорослей.

Вспомогательные индексы  $E_{430}/E_{530}$  и  $E_{664}/E_{530}$  отражают соотношение максимального поглощения в синей и красной области спектра в соответствии с минимальным значением в центральной области спектра. Причем, проанализировав данные, видно, что индекс  $E_{430}/E_{530}$  дает в 2 раза большее значение,

чем индекс  $E_{664}/E_{530}$  для всех типов водоемов. Индексы  $E_{664}/E_{720}$  и  $E_{430}/E_{720}$  показывают максимальное поглощение синей и красной области спектра соответственно к минимальному (фоновому) значению в красной области спектра, при этом значение  $E_{664}/E_{720}$  также меньше индекса  $E_{430}/E_{720}$ , что связано с большей высотой пика поглощения в синей области спектра. Если сравнить между собой индексы  $E_{430}/E_{720}$  и  $E_{412}/E_{720}$ , то прослеживается аналогичная ситуация, как и с индексами  $E_{412}/E_{664}$ ,  $E_{430}/E_{664}$ , то есть для рыбоводческих прудов значения индекса  $E_{412}/E_{664}$  выше, а для рек – выше значения индекса  $E_{430}/E_{664}$ . Индекс  $E_{530}/E_{720}$  свидетельствует о соотношении минимального значения в синей области спектра к минимальному (фоновому) значению в красной области спектра, пределы изменения этого индекса в нашем исследовании – от 0,4 до 35. Индексы  $E_{480}/E_{664}$  и  $E_{480}/E_{665}$  дают примерно одинаковые значения для всех исследованных водных объектов – от 0,67 до 1,15.

Исходя из полученных данных, можно заключить, что все исследуемые индексы информативны и их можно использовать в качестве маркеров состояния фитопланктонного сообщества.

### Заключение

В результате проведенной работы были проанализированы спектры поглощения в диапазоне длин волн 350 нм – 800 нм для разнотипных водных объектов, отобранных в разные периоды вегетационного сезона. В ходе работы нами установлено, что нет статистически значимой разницы между значениями светопоглощения на длине волны 720 нм и 750 нм, поэтому можно сократить длину изучаемого отрезка спектра с 750 до 720 нм, что уменьшит объем временных затрат на получение спектра и ускорит анализ данных.

Для расчета пигментных индексов спектр поглощения экстракта следует снимать в диапазоне 400–720 нм (можно 350–720 нм). Далее из анализа следует исключить пробы, у которых пигментный спектр не прописывался, либо был не четким (например, высокое фоновое светопоглощение примесей на длине волны 720 нм). Одним из критериев информативности пигментных индексов мы предлагаем ввести хорошо прописанные спектры пигментов. Для «контроля качества» спектров предлагаем использовать дополнительные индексы ( $E_{412}/E_{664}$ ,  $E_{664}/E_{530}$ ,  $E_{430}/E_{530}$ ,  $E_{530}/E_{720}$ ,  $E_{664}/E_{720}$ ,  $E_{430}/E_{720}$ ,  $E_{412}/E_{720}$ ), отражающие соотношение поглощения на пиках и спадах пигментного спектра.

Если спектр поглощения экстракта пигментов прописывается четко, то расчет и анализ пигментных индексов может дать важную информацию о составе фитопланктона и его состоянии. Таким образом, при грамотном подходе пигментные индексы могут быть использованы в качестве одного из параметров оценки качества воды для всех типов водоемов вне зависимости от уровня их трофии и состояния фитопланктона.

### Библиографические ссылки

1. Винберг Г. Г. Первичная продукция водоемов. Минск, 1960.
2. Минеева Н. М. Растительные пигменты в воде волжских водохранилищ. М., 2004.
3. Сигарева Л. Е. Хлорофилл в донных отложениях волжских водоемов. М., 2012.
4. ГОСТ 17.1.04.02.90. Вода. Методика спектрофотометрического определения хлорофилла-а. М., 2009.
5. Lorenzen C. J. Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations // *Limnol. Oceanogr.* 1967. Vol. 12. P. 343–346.
6. Сиделев С. И., Бабаназарова О. В. Анализ связей пигментных и структурных характеристик фитопланктона высокоэвтрофного озера // *J. of Siberian Federal University. Biology.* 2008. Vol. 2, № 1. P.162–177.
7. Смольская О. С. Пигментные индексы, содержание сестона и хлорофилла-а в русловых и зарегулированных участках р. Свислочь в районе г. Минска // Биологическая осень 2017: к Году науки в Беларуси: тез. докл. Междунар. науч. конф. молодых ученых, 9 нояб. 2017 г. Минск, 2017. С. 218–220.
8. Сулимова О. С., Жукова А. А., Адамович Б. В. Оценка связи спектральных характеристик пигментного состава фитопланктона и вклада синезеленых водорослей в его общую биомассу // Сб. тр. V всеукр. науч.-практ. конф. «Біологічні дослідження-2014» молодых ученых и студентов. (Житомир, 4–6 апреля 2014 г.). Житомир, 2014. С. 221–223.
9. Блакітны скарб Беларусі: энцыклапедыя. Мінск, 2007.
10. Сигарева Л. Е. О влиянии характера механического разрушения фитопланктона на степень экстрагирования его пигментов // Биология внутренних вод: Информ. бюл. 1974. № 24. С. 8–11.
11. SCOR-UNESCO Working group № 17. Determination of photosynthetic pigments in sea-water // *Monographs on Oceanologic Methodology.* UNESCO, Paris, 1966. P. 9–18.
12. Nayek S., Choudhury Imranul H., Jaishee N., et al. Spectrophotometric Analysis of Chlorophylls and Carotenoids from Commonly Grown Fern Species by Using Various Extracting Solvents // *Research J. of Chemical Sciences.* 2014. Vol. 4, № 9. P. 63–69.
13. Ritchie R. J. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organism using acetone, methanol, or ethanol solvents // *Photosynthetica.* 2008. Vol. 46, № 1. P. 115–126.
14. Остапеня А. П. Полнота окисления органического вещества водных беспозвоночных методом бихроматного окисления // Докл. АН БССР. 1965. Т.9, № 4. С. 273–276.
15. Мастоцкий, С. Э. Методическое пособие по использованию программы STATISTICA при обработке данных биологических исследований. Минск, 2009.

16. Сigareва Л. Е., Ляшенко О. А. Значимость пигментных характеристик фитопланктона при оценке качества воды // Водные ресурсы. 2004. Т. 31, № 4. С. 475–480.
17. Станиславская Е. В. Пигментные характеристики перифитона озерно-речных систем урбанизированных территорий // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2016. Т. 18, № 2 (2). С. 502–506.

## References

1. Vinberg G. G. Pervichnaya produktsiya vodoyemov [Primary production of reservoirs]. Minsk, 1960 (in Russ.).
2. Mineyeva N. M. Rastitel'nyye pigmenty v vode volzhskikh vodokhranilishch [Vegetable pigments in the water of the Volga reservoirs]. Moscow, 2004 (in Russ.).
3. Sigareva L. Ye. Khlorofill v donnykh otlozheniyakh volzhskikh vodoyemov [Chlorophyll in bottom sediments of Volga reservoirs]. Moscow, 2012 (in Russ.).
4. GOST 17.1.04.02.90. Voda. Metodika spektrofotometricheskogo opredeleniya khlorofilla-a [Water. The method of spectrophotometric determination of chlorophyll-a]. Moscow, 2009 (in Russ.).
5. Lorenzen C. J. Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.* 1967. Vol. 12. P. 343–346.
6. Sidelev S. I., Babanazarova O. V. Analiz svyazey pigmentnykh i strukturnykh kharakteristik fitoplanktona vysokoevτροφного озера [Analysis of pigment and structural characteristics of phytoplankton in a highly eutrophic lake]. *J. of Siberian Federal University. Biology.* 2008. Vol. 2, No. 1. P.162–177 (in Russ.).
7. Smol'skaya O. S. Pigmentnyye indeksy, sodержaniye sestona i khlorofilla-a v ruslovykh i zaregulirovannykh uchastkakh r. Svisloch' v rayone g. Minska [Pigment indices, content of seston and chlorophyll-a in riverbed and overregulated sections of the Svisloch River in the Minsk region]. *Biologicheskaya osen' 2017: k Godu nauki v Belarusi: tez. dokl. Mezhdunar. nauch. konf. molodykh uchennykh*, 9 noyab. 2017 g. Minsk, 2017. P. 218–220 (in Russ.).
8. Sulimova O. S., Zhukova A. A., Adamovich B. V. Otsenka svyazi spektral'nykh kharakteristik pigmentnogo sostava fitoplanktona i vklada sinezelenykh vodorosley v yego obshchuyu biomassu [Evaluation of the relationship between the spectral characteristics of the phytoplankton pigment composition and the contribution of blue-green algae to its general biomass]. *Sb. tr. V vseukr. nauch.-prakt. konf. «Biologichni doslidzhennya-2014» molodykh uchennykh i studentov.* (Zhitomir, 4–6 April 2014 g.). Zhitomir, 2014. P. 221–223 (in Russ.).
9. Blakitny skarb Belarusi: entsiklopediya [Blank are the belongings of Belarus: encyclopedia]. Minsk, 2007 (in Belarusian).
10. Sigareva L. Ye. O vliyaniy kharaktera mekhanicheskogo razrusheniya fitoplanktona na stepen' ekstragirovaniya yego pigmentov [About the influence of the nature of the mechanical destruction of phytoplankton on the degree of extraction of its pigments]. *Biologiya vnutrennikh vod: Inform. byul.* 1974. No. 24. P. 8–11 (in Russ.).
11. SCOR-UNESCO Working group № 17. Determination of photosynthetic pigments in sea-water. *Monographs on Oceanologic Methodology.* UNESCO, Paris, 1966. P. 9–18.
12. Nayek S., Choudhury Imranul H., Jaishee N., et al. Spinectrophotometric Analysis of Chlorophylls and Carotenoids from Commonly Grown Fern Species by Using Various Extracting Solvents. *Research J. of Chemical Sciences.* 2014. Vol. 4, No. 9. P. 63–69.
13. Ritchie R. J. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organism using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica.* 2008. Vol. 46, No. 1. P. 115–126.
14. Ostapenya A. P. Polnota okisleniya organicheskogo veshchestva vodnykh bespozvonochnykh metodom bikhromatnogo okisleniya [Completeness of oxidation of organic matter of aquatic invertebrates by the method of bichromate oxidation]. *Dokl. AN BSSR.* 1965. T. 9, No. 4. P. 273–276 (in Russ.).
15. Mastitskiy, S. E. Metodicheskoye posobiye po ispol'zovaniyu programmy STATISTICA pri obrabotke dannykh biologicheskikh issledovaniy [Methodological manual on the use of the STATISTICA program in the processing of biological research data]. Minsk, 2009 (in Russ.).
16. Sigareva L. Ye., Lyashenko O. A. Znachimost' pigmentnykh kharakteristik fitoplanktona pri otsenke kachestva vody [Importance of pigment characteristics of phytoplankton in water quality assessment]. *Vodnyye resursy.* 2004. T. 31, No. 4. P. 475–480 (in Russ.).
17. Stanislavskaya Ye. V. Pigmentnyye kharakteristiki perifitona ozerno-rechnykh sistem urbanizirovannykh territoriy [Pigment characteristics of the periphyton of lake-river systems of urbanized territories]. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk.* 2016. T. 18, No. 2 (2). P. 502–506 (in Russ.).

Статья поступила в редколлегию 05.02.2018  
Received by editorial board 05.02.2018