

ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКА РАЗМЕРНЫХ ФРАКЦИЙ ПЛАНКТОНА В АКВАТОРИИ Г. СЕВАСТОПОЛЬ ЗИМОЙ 2021-2022 ГГ: МОДЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Уфимцева М.А.¹, Кузнецов А.В.^{1,2}

¹ Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН

просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ

² Севастопольский государственный университет,

ул. Университетская 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: ritica011@bk.ru

Поступила в редакцию 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0575

Аннотация. С целью мониторинга акватории г. Севастополя разработана линейка устройств последовательной макрофильтрации планктона в размерном диапазоне от 2 мм до 2 мкм. Выбраны 12 станций от Инкермана до Фиолента общей протяжённостью 30 км. С пирсов, далеко выступающих в море, отобраны с поверхности воды по 50-500 л морской воды и профильтрованы через систему последовательных сит 2 мм, 300, 150, 84 мкм и волоконный фильтр 2 мкм. Зимой 2021-2022 гг., когда температура морской воды составляла 8 °С, разнообразие планктонных морфотипов было незначительным. Для всех станций число морфотипов увеличивалось с уменьшением размерной фракции в виде экологических пирамид. Установлено, что богатство морфотипов в Инкермане значительно ниже, чем на других станциях. Пробы с соседних станций могут отличаться по составу морфотипов до 50% (пространственный срез). Также на 50% отличались по составу морфотипов пробы морской воды, взятые на одной станции с интервалом 1,5 месяца (временной срез). Полученные результаты свидетельствуют, что разработанная методика последовательной фильтрации даёт наглядное представление о состоянии мезо-, микро- и нано-планктона в пробах морской воды.

Ключевые слова: мониторинг, последовательная фильтрация, планктон.

ВВЕДЕНИЕ

Мониторинг экологической ДНК (eDNA - environmental DNA) является перспективным инструментом контроля окружающей среды [1,2]. Однако недавние исследования [3] показали, что явное представительство определённых видов не обязательно коррелирует с наличием их ДНК в пробах из природной среды, как и наоборот, ДНК вида может обнаруживаться, а сами представители отсутствовать в пробах. Это неожиданное обстоятельство подняло вопрос о взаимодополняющем генетическом и морфологическом анализе образцов. К сожалению, существующие методы отбора и оценки планктонных проб [4,5] достаточно трудоёмки, поэтому ощущается потребность в эффективных методах выявления отдельных представителей биоты пелагиали в природных популяциях.

Традиционно, отбор проб планктона ведётся с помощью сетей Апштейна или Джеди. Эффективным методом сбора микроорганизмов может быть забор воды с помощью насоса с последующей фильтрацией. Такое оборудование было установлено на яхте *Sorcerer II*, принадлежащей институту *Крейга Вентера*, для выполнения метагеномных проектов [6]. Учёными из Института Океанографии Национального Тайваньского Университета была разработана установка для высокопроизводительной многослойной фильтрации, сочетающая в себе достоинства конической сети Апштейна и системы последовательных фильтров [7].

Использование каскада последовательных фильтров для сепарации размерных фракций планктона имеет как явные преимущества, так и скрытые недостатки. К преимуществам метода относятся компактность установки фильтрации, её производительность, возможность отбирать образцы с помощью насоса и фракционирование образцов по размерам. Недостатком является хрупкость биологических объектов, возможность их разрушения и проникновение фрагментов в нижележащие фракции, что может приводить к контаминации.

Целью работы была разработка устройства для макрофильтрации планктонных организмов, представляющего набор последовательных сит с уменьшающимися размерами отверстий, а также исследование пространственно-временных характеристик планктонного сообщества с размером гидробионтов от 2 мм до 2 мкм в акватории г. Севастополя в зимний период для демонстрации работоспособности устройства.

МЕТОДИКА

Устройство последовательной фильтрации является набором пластиковых труб, которые можно вставлять друг в друга. В местах состыковки трубок прокладывается газ с ячейками уменьшающегося размера. На входе трубы расположена воронка и предварительное сито с размером ячеек 2 мм. Применяли установку, состоящую из 4-5 секций. На концах фильтрующей сборки расположены муфты с карабинами, через которые продевается репшнур, скрепляющий всю модульную конструкцию, которая устанавливается на сошки. Применяли сита с ячейками 300, 150 и 84 мкм, а также волоконный фильтр EN14683 с размером пор 1-5 мкм.

Конструкторские разработки и научные исследования проводились с ноября 2021 года по март 2022 года. Основные полевые испытания осуществлены в январе-феврале 2022 года.

Список экспериментальных станций. Пробы воды отбирали с помощью ведра с верхнего горизонта 0-0,5 м с пирсов и волноломов, далеко выступающих в море. Выбрано 12 станций от Инкермана до м. Фиолент общей протяжённостью 30 км: 0) Инкерман, причал №49, 1) Учкучевка-Любимовка, пляж Альбатрос, левый пирс, 2) Северная, паромный причал, 3) Водная станция, причал №148, 4) Артиллерийская бухта, паромный причал, 5) пляж Хрустальный (Якорь), 6) Гавань, РБК ИнБИОМ, 7) Песочная бухта, Солнечный пирс, 8) парк Победы, правый мол, 9) пляж Омега, первый пирс, 10) Казачья (Солёная) бухта, правый пирс, 11) мыс Фиолент, пляж Каравелла, причал.

Обработка проб. Биологический материал смывали с фильтров 5 мл физиологического раствора или искусственной морской воды, фиксировали глутаровым альдегидом до конечной концентрации 2,5% и хранили в холодильнике при 4 °С. Аликвоту 200 мкл анализировали на часовом стекле под бинокулярной лупой ZEISS Stemi 305 при увеличении от 8 до 40 крат, а затем исследовали на предметном стекле под микроскопом Nikon Eclipse Ts2R при увеличении 200 раз. Идентификацию видов осуществляли, пользуясь определителями [8-12].

Морфотип. В силу того, что у криптических видов диагностические признаки малозаметны, проводили идентификацию представителей планктона с точностью до рода и использовали понятие «морфотип», т.е. сводили в одну категорию все объекты, обладающие заранее обусловленными одинаковыми морфологическими признаками, что значительно ускорило работу.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Уникальность зимнего сезона 2021-2022 гг. заключается в том, что температура морской воды в акватории г. Севастополя составляла 8°С, не было сильных штормов и ветров, заметных сгонов и нагонов воды. Тем не менее, локальное волнение моря при отборе проб на станциях №0-11 значительно отличалось, что отразилось на содержании взвешенных частиц в пробах.

Итог изучения размерных фракций планктона на разных станциях. Экологическую обстановку в пространственных координатах изучали на примере 12 станций, расположенных вдоль берега от Инкермана до мыса Фиолент. Строили диаграммы распределения числа морфотипов по размерным фракциям для разных станций. Для всех станций, кроме точки №0 (Инкерман, причал №49), отмечено возрастание количества морфотипов гидробионтов с уменьшением их геометрического размера (рис. 1). Станция №0 отличается от остальных тем, что находится глубоко во внутренней акватории Северной бухты недалеко от устья Чёрной речки и характеризуется самым низким разнообразием морфотипов в зимний период.

Изменение состава планктонного сообщества размерной фракции плюс 84 мкм – минус 1-5 мкм в пространстве и во времени. Для того чтобы оценить размах вариаций в пробах с исследуемых станций №0-11 и отличить флуктуации от трендов, были проведены сравнения представительства отдельных морфотипов в пробах, разнесённых в пространстве или во времени. Изучали планктон размером от 84 до 1-5 мкм. Оказалось, что пробы с соседних станций №3 (Водная станция) и №4 (Артиллерийская бухта) могут отличаться по составу

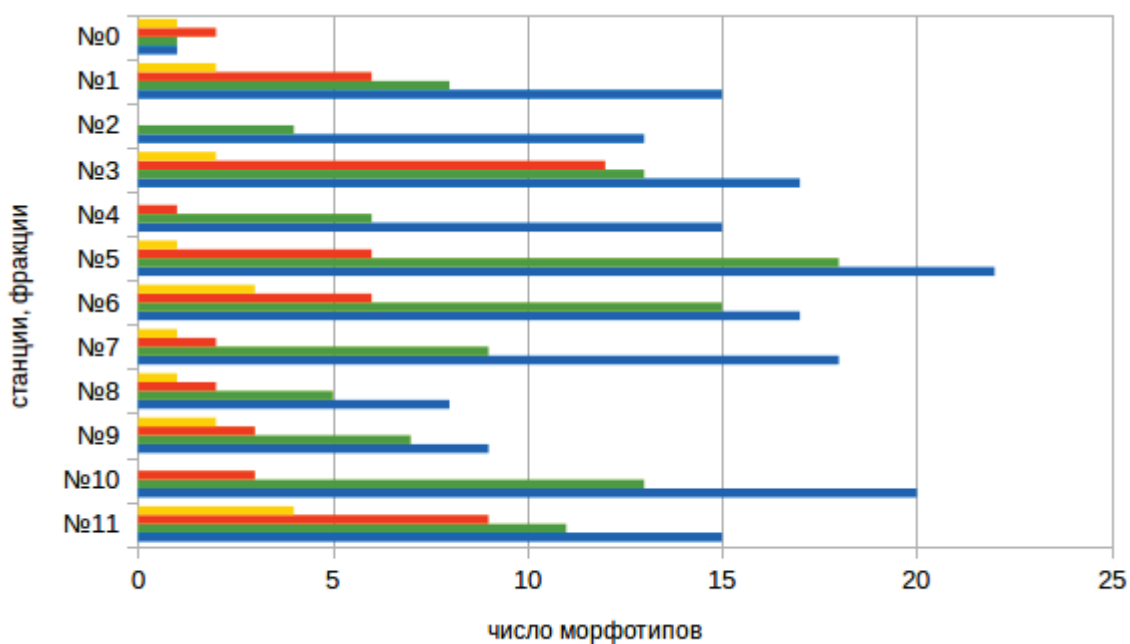


Рисунок. 1. Распределение планктонных организмов по размерам на экспериментальных станциях от Инкермана до мыса Фиолент, г. Севастополь, жёлтый цвет – сито с размером ячеек 300 мкм, красный – 150 мкм, зелёный – 84 мкм, голубой цвет – фильтр с размером пор 1-5 мкм

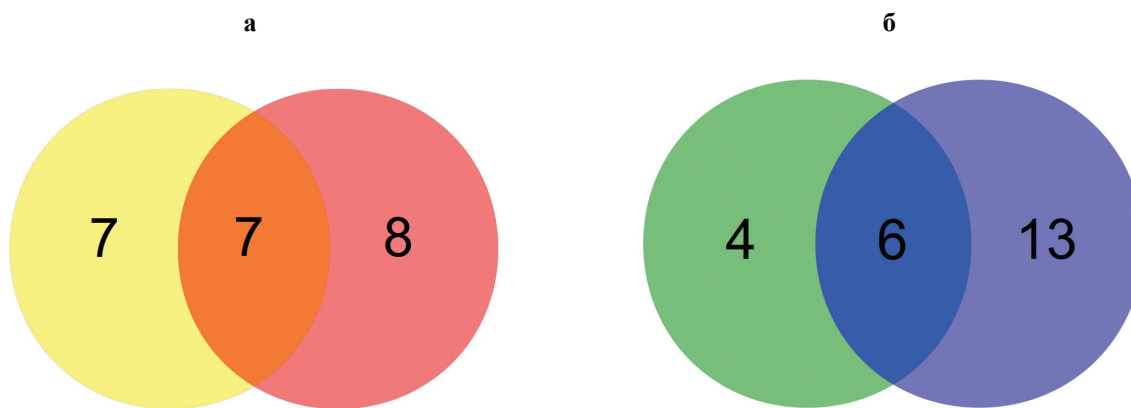


Рисунок 2. Круги Эйлера, построенные при анализе морфотипов биообъектов, которые были смыты с фильтра 1-5 мкм, для станций №3 от 11.02.22 и №4 от 13.02.22 (а), а также для станции №3 от 29.01.22 и 18.03.22 (б), соответственно, пересечение обозначает число общих морфотипов

морфотипов на 50% (рис. 2а). Также на 50% отличались по составу морфотипов пробы морской воды, взятые на станции №3 с интервалом 1,5 месяца (рис. 2б). Разительные отличия как по разнообразию морфотипов, так и по численности отдельных представителей выявлены для удалённых станций №0 (Инкерман) и №11 (Фиолент).

ОБСУЖДЕНИЕ

Критический анализ фильтрации планктона был дан в работе Микаэляна А.С. и Ведерникова В.И. «Фракционирование фитопланктона: проблемы и возможности» (1989 г.), где авторы отмечают, что работы по фракционированию планктона, проводились ещё в середине XX века и были посвящены разделению на сетной планктон и нанопланктон. В последующих исследованиях планктон разделяли по фракциям на нейлоновых ситах с размерами ячеек от 200 до 10 мкм. В современных исследованиях, благодаря применению ядерных фильтров, все большее внимание уделяется размерным фракциям менее 1-5 мкм. Несмотря на ряд недостатков разделение на фракции через различные фильтрующие материалы остаётся единственным подходом к исследованию структурно-функциональных характеристик разных размерных категорий планктона. В пределах метода фракционирования имеются методические различия. Например, при определении продукционных возможностей разных фракций микроводорослей, существенное значение имеют пре- или постфильтрация проб. При параллельном способе подпробы фильтруют через фильтры с разным диаметром пор и по разнице между контролем и опытом оценивают структурно-функциональные характеристики каждой фракции. При этом возникают неточности из-за различия исходного материала в подпробах. При последовательной фильтрации пробу пропускают через каскад фильтров. Планктонные организмы могут повреждаться, проходя через серию фильтров. На результат фракционирования влияет скорость прохождения воды через фильтры, количество взвеси, объем профильтрованной воды и т.д. [13].

Исследования по экологической ДНК, в отличие от фильтрации планктона, имеют короткую историю [14,15]. Тем не менее, становится понятно, что организмы по-разному «выплёскивают» свою ДНК в окружающую среду, что необходимо учитывать при мониторинге окружающей среды и интерпретации результатов исследований [3]. Необходимо совмещать методы молекулярной биологии и микроскопии для воссоздания целостной картины.

В настоящей работе обнаружено необычайно низкое разнообразие планктонных организмов на станции Инкерман в зимний период, которая находится во внутренней акватории Северной бухты недалеко от места впадения Чёрной речки (рис. 1). Таким образом, фракционирование планктонных организмов по размерам может быть использовано для анализа функционального состояния планктонных сообществ [16,17].

При тщательном отборе проб сохраняется «экологическая пирамида» [18] для размерных фракций планктона внутри отдельных проб, однако число морфотипов и их состав может варьировать, что указывает на неоднородность распределения планктонного сообщества во времени и пространстве. Оказалось, что пробы с соседних станций могут отличаться по составу морфотипов на 50%. Также на 50% отличались пробы морской воды, взятые на станции №3 с интервалом 1,5 месяца, как следствие увеличения продолжительности светового дня.

В дополнение ко всему, мы оценивали биопродуктивность размерных фракций по отношению хлорофилл А/общий белок, где, как и другие авторы, обнаружили, падение биопродуктивности с увеличением размера планктонной фракции; кроме того, метод хорошо себя зарекомендовал при оценке микропластикового загрязнения и в тесте по скорости оседания взвешенных неорганических частиц (данные не приводятся).

Выводы и перспективы. Полученные результаты показывают, что разработанная методика последовательной фильтрации даёт наглядное представление о состоянии мезо-, микро- и нано-планктона в

пробах морской воды. Предполагается использовать созданное устройство для экспресс-мониторинга окружающей среды, при сборе материала для биохимических и генетических анализов, а также для предварительной очистки проб в вирусологических исследованиях. Имеется возможность сократить число секций до 2-3, тем самым удешевив устройство и создав предпосылки для его массового изготовления, что позволит осуществлять единовременный сбор материала на нескольких станциях. Предложенный путь параллелизации находится внутри основной «lab-on-chip» [19] концепции миниатюризации, автоматизации и интеграции в сеть автономных устройств мониторинга окружающей среды.

Авторы глубоко признательны за поддержку Пирковой А.В., Челябиной Н.С., Попову М.А., Поспеловой Н.В. и Железновой С.Н., а также участникам проекта «Трихоплак для бионики».

Список литературы / References:

1. Stoeckle B.C., Kuehn R., Geist J. Environmental DNA as a monitoring tool for the endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.): a substitute for classical monitoring approaches? *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.*, 2016, vol. 26, no. 6, pp. 1120-1129.
2. Zhang Y., Pavlovska M., Stoica E., Prekrasna I., Yang J., Slobodnik J., Zhang X., Dykyi E. Holistic pelagic biodiversity monitoring of the Black Sea via eDNA metabarcoding approach: From bacteria to marine mammals. *Environ Int.*, 2020, vol. 135, p. 105307.
3. Kawashima T., Yoshida M.A., Miyazawa H., Nakano H., Nakano N., Sakamoto T., Hamada M. Observing Phylum-Level Metazoan Diversity by Environmental DNA Analysis at the Ushimado Area in the Seto Inland Sea. *Zoolog Sci.*, 2022, vol. 39, no. 1, pp. 157-165, doi: 10.2108/zs210073.
4. Беклемишев К.В. *Экология и биогеография пелагиали*. М.: Наука, 1969, 291 с. [Beklemishev K.V. *Ekologiya i biogeografiya pelagiali*. М.: Nauka, 1969, 291 p. (In Russ.)]
5. Киселёв И.А. *Планктон морей и континентальных водоёмов*. Л.: Наука, 1969, т. 1, 658 с. [Kiselyov I.A. *Plankton morej i kontinental'nyh vodojotov*. L.: Nauka, 1969, vol. 1, 658 p. (In Russ.)]
6. Williamson S.J., Rusch D.B., Yooseph S., Halpern A.L., Heidelberg K.B., Glass J.I., Andrews-Pfannkoch C., Fadrosch D., Miller C.S., Sutton G., Frazier M., Venter J.C. The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: metagenomic characterization of viruses within aquatic microbial samples. *PLoS One*, 2008, vol. 3, no. 1, p. e1456.
7. Wen L.S., Lee C.P., Lee W.H., Chuang A. An Ultra-clean Multilayer Apparatus for Collecting Size Fractionated Marine Plankton and Suspended Particles. *J Vis Exp.*, 2018, vol. 134, p. 56811.
8. Киселев И.А. *Панцирные жгутиконосцы (Dinoflagellata) морей и пресных вод СССР*. Определ. по фауне СССР. Л.: Изд-во Зоол. ин-та АН СССР, 1950, № 33, 280 с. [Kiselev I.A. *Pancirnye zhgutikonoscy (Dinoflagellata) morej i presnyh vod SSSR*. Opredel. po faune SSSR. L.: Izd-vo Zool. in-ta AN SSSR, 1950, № 33, 280 p. (In Russ.)]
9. Прошкина-Лавренко АИ. *Диатомовые водоросли планктона Чёрного моря*. М.-Л.: АН СССР, 1955, 222 с. [Proshkina-Lavrenko AI. *Diatomovye vodorosli planktona CHyornogo morya*. М.-Л.: AN SSSR, 1955, 222 p. (In Russ.)]
10. Мордухай-Болтовской ФД. *Определитель беспозвоночных животных фауны Чёрного и Азовского морей*, 3 тома. Киев: "Киевская книжная фабрика", 1969. [Morduhaj-Boltovskoj FD. *Opredelitel' bespozvonochnyh zhivotnyh fauny CHyornogo i Azovskogo morej*, 3 тома. Kiev: "Kievskaya knizhnaya fabrika", 1969. (In Russ.)]
11. Молло П., Нури А. *Планктон*. Учебное пособие. пер. с фр. В. И. Холодова. Севастополь, 2019, 195 с. [Mollo P., Nuri A. *Plankton*. Uchebnoe posobie. per. s fr. V. I. Holodova. Sevastopol', 2019, 195 p. (In Russ.)]
12. Рябушко Л.И. *Потенциально опасные микроводоросли Чёрного и Азовского морей*. НАНУ, Институт биологии южных морей НАН Украины, Океанологический центр НАНУ, Операционный Центр Международного Института в Украине, Севастополь: ЭКОСИ - Гидрофизика, 2003, 288 с. [Ryabushko L.I. *Potencial'no opasnye mikrovodorosli CHyornogo i Azovskogo morej*. NANU, Institut biologii yuzhnyh morej NAN Ukrainy, Okeanologicheskij centr NANU, Operacionnyj Centr Mezhdunarodnogo Instituta v Ukraine, Sevastopol': EKOSI - Gidrofizika, 2003, 288 p. (In Russ.)]
13. Микаэлян А.С., Ведерников В.И. Фракционирование фитопланктона: проблемы и возможности. Структурные и продукционные характеристики планктонных сообществ Чёрного моря. Сб. Ред. М.Е. Виноградов, М.В. Флинт. М.: Наука, 1989, с. 53-64. [Mikaelyan A.S., Vedernikov V.I. Frakcionirovanie fitoplanktona: problemy i vozmozhnosti. Strukturnye i produkcionnye harakteristiki planktonnyh soobshchestv CHyornogo morya. Sb. Red. M.E. Vinogradov, M.V. Flint. М.: Nauka, 1989, pp. 53-64. (In Russ.)]
14. Ruppert K.M., Kline R.J., Rahman M.S. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation*, 2019, vol. 17, p. e00547.
15. Cowart D.A., Murphy K.R., Cheng C.C. Environmental DNA from Marine Waters and Substrates: Protocols for Sampling and eDNA Extraction. *Methods Mol Biol.*, 2022, vol. 2498, pp. 225-251.
16. Виноградов М.Е., Флинт М.В. Структура и продукционные характеристики планктонных сообществ Чёрного моря. *Сборник научных трудов*. М.: Наука, 1989, 226 с. [Vinogradov M.E., Flint M.V. Struktura i produkcionnye harakteristiki planktonnyh soobshchestv CHyornogo morya. *Sbornik nauchnyh trudov*. М.: Nauka, 1989, 226 p. (In Russ.)]
17. Минеева Н.М. *Эколого-физиологические аспекты формирования первичной продукции планктона водохранилищ Волги*. Дис. на соискание д.б.н. по ВАК РФ 03.00.16, Борок, 2003. [Mineeva N.M. *Ekologo-*

fiziologicheskie aspekty formirovaniya pervichnoj produkcii planktona vodohranilishch Volgi. Dis. na soiskanie d.b.n. po VAK RF 03.00.16, Borok, 2003. (In Russ.)]

18. Colombet J., Fuster M., Billard H., Sime-Ngando T. Femtoplankton: What's New? *Viruses*, 2020, vol. 12, no. 8, p. 881.

19. Dutse S.W., Yusof N.A. Microfluidics-based lab-on-chip systems in DNA-based biosensing: an overview. *Sensors (Basel)*, 2011, vol. 11, no. 6, pp. 5754-5768.

EXPRESS ESTIMATION OF PLANKTON SIZE FRACTIONS IN THE WATER AREA OF SEVASTOPOL IN WINTER 2021-2022: MODEL STUDIES

Ufimtseva M.A.¹, Kuznetsov A.V.^{1,2}

¹ Institute of Biology of the South Seas named after A.O. Kovalevsky RAS
Nakhimov ave., 2, Sevastopol, 299011, Russia

² Sevastopol State University
Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: ritica011@bk.ru

Received 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0575

Abstract. For the purpose of monitoring the water area of Sevastopol a line of devices for plankton macrofiltration in the size range from 2 mm to 2 microns has been developed. Twelve stations have been chosen from Inkerman to Fiolent with total length of 30 km. From piers far out at sea, 50-500 liters of seawater were sampled from the surface and filtered through a system of successive sieves 2 mm, 300, 150, 84 microns and a 2 μ m fiber filter. In the winter of 2021-2022, when the seawater temperature was 8 °C, the diversity of plankton morphotypes was low. For all stations, the number of morphotypes increased as the size fraction decreased in the form of ecological pyramids. It was found that the richness of morphotypes in Inkerman is significantly lower than at other stations. Samples from neighboring stations may differ in the composition of morphotypes up to 50% (spatial section). Also, sea water samples taken at the same station with an interval of 1.5 months differed by 50% in the composition of morphotypes (time slice). The obtained results indicate that the developed technique of sequential filtration gives a visual representation of the state of meso-, micro- and nano-plankton in seawater samples.

Key words: *monitoring, sequential filtration, plankton.*