

ЭКОЛОГИЯ МОРЯ



13
—
1983

описанные выше, либо измерять одновременно поглощение и выведение ^{32}P организмами, хотя последнее связано с рядом методических трудностей.

1. *Методы гидрохимических исследований океана* / Под ред. О. К. Бордовского, В. Н. Иваненко.— М.: Наука, 1978.— 171 с.
2. *Сорокин Ю. И., Вышкварцев Д. И.* Исследование потребления минерального фосфата планктонным сообществом тропических вод.— *Океанология*, 1974, 14, вып. 4, с. 688—692.
3. *Федоров В. К., Сорокин Ю. И.* Потребление минерального фосфата фитопланктоном и бактериями в водах восточной части Тихого океана по измерениям с помощью ^{32}P .— *Тр. Ин-та океанологии*, 1975, 102, с. 199—205.
4. *Финенко З. З.* Продукция фитопланктона.— В кн.: *Основы биологической продуктивности Черного моря*. Киев: Наук. думка, 1979, с. 88—99.
5. *Harrison W. C., Azam F., Renger E. H., Epplly R. W.* Some experiments on phosphate assimilation by coastal marine plankton.— *Mar. Biol.*, 1977, 40, p. 9—18.
6. *Perry M. J.* Phosphate utilization by an oceanic diatome in phosphorus — limited chemostat culture and in the oligotrophic waters of the central North Pasific.— *Limnol. and Oceanogr.*, 1976, 21, N 1, p. 88—107.
7. *Perry M. J., Epplly R. W.* Phosphate uptake by phytoplankton in the central North Pacific Ocean Deep-Sea Res, 1979, 28a, p. 39—49.
8. *Taft J. L., Taylor W. R., McCarthy J.* Uptake and release of phosphorus by phytoplankton in the chesapeake bay estuary USA.— *Mar. Biol.*, 1975, 33, p. 21—32.

Институт биологии южных морей
им. А. О. Ковалевского АН УССР

Поступила в редколлегию
19.10.81

A. V. PARKHOMENKO, Z. Z. FINENKO,
V. N. EGOROV

PECULIARITIES OF DETERMINATION OF INORGANIC PHOSPHORUS ABSORPTION BY MICROPLANKTON IN OLIGOTROPHIC WATERS APPLYING A RADIOISOTOPIC INDICATOR

Summary

The paper is concerned with a problem on the ratio of inorganic phosphorus absorbed and assimilated by the Black Sea microplankton with its low concentrations in water. The data calculated from kinetics of ^{32}P absorption by microplankton show that assimilation of inorganic phosphorus by microplankton accounts for 12% of the total absorbed amount. A method is suggested to determine the part of phosphorus assimilated by microplankton from ^{32}P absorption kinetics.

УДК 581.526.325:547 (267.37)

А. Г. БЕНЖИЦКИЙ

ОПЫТ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТА В МИКРОПЛАНКТОНЕ АРАВИЙСКОГО МОРЯ

В настоящее время для количественной оценки живого вещества в морях и океанах широко используют сравнительно чувствительный индикатор — аденозинтрифосфорную кислоту (АТФ), присущую только живым организмам и выполняющую важную роль в процессах обмена вещества и энергии в клетках [1, 2].

В 1946 г. Мак Элрой [10] открыл специфическую способность АТФ вызывать *in vitro* световое излучение при добавлении ее к водным экстрактам светоносных органов светляков, что легло в основу метода количественного определения АТФ. Принцип метода заключается в изменении интенсивности светового потока, который возникает при добавлении к раствору препарата люциферин-люциферазы пробы, содержащей аденозинтрифосфат. Метод количественного определения АТФ введен и в практику гидробиологических исследований [4]. В дальнейшем был предложен расчет биомассы микрор-

ганизмов (бактерий и водорослей) в виде произведения величины концентрации АТФ в объеме пробы на 250. Этот множитель является величиной постоянной, так как АТФ составляет 0,4% содержания клеточного углерода [1, 3, 4]. Исследованиями [8] определены пересчетные коэффициенты для чистых культур бактерий (500) и монокультур микрозоопланктона (предельные значения 50—100). Для суммарного микропланктона, состоящего, как известно, из бактерий, фито- и микрозоопланктона, был принят пересчетный коэффициент, равный 250 [1, 3, 7].

Однако использование данных АТФ-метода для расчета суммарной биомассы микропланктона ограничено.

1. Поскольку концентрация АТФ различна не только у разных групп организмов, но даже у организмов одного вида, вариации пересчетного коэффициента могут быть значительными, а следовательно, оценка биомассы недостоверна [1].

2. Оценка суммарной биомассы микропланктона не представляет большого интереса, так как не позволяет судить о представителях разных трофических уровней [3].

Тем не менее АТФ-метод является в настоящее время признанным экспресс-методом оценки обилия живого вещества в море и служит для расчета биомассы микропланктона при условии введения поправочных коэффициентов [1, 3, 8].

В последние годы появились работы по совершенствованию АТФ-метода. В описанной ниже методике определения АТФ в микропланктоне учтены основные поправки, предложенные в работах [5—8].

Во время 22-го рейса НИС «Академик Вернадский» (март — июль 1980 г.) на двух микрополигонах (координаты: $8^{\circ}30' - 9^{\circ}30'$ с. ш., $57^{\circ}00' - 59^{\circ}00'$ в. д. и $8^{\circ}30' - 9^{\circ}00'$ с. ш., $55^{\circ}00' - 57^{\circ}40'$ в. д.), полигоне (координаты: $9^{\circ}40' - 12^{\circ}20'$ с. ш., $58^{\circ}00' - 62^{\circ}00'$ в. д.) и разрезах по $65^{\circ}20' - 67^{\circ}20'$ в. д. в Аравийском море собирали пробы микропланктона для определения в них содержания АТФ.

Методы исследования. *Отбор проб морской воды и концентрирование микропланктона.*

Пробы морской воды отбирали с помощью винипластовых батометров, а чтобы предотвратить попадание в них крупного планктона, воду фильтровали через мельничное сито (газ № 38). Полиэтиленовые емкости, служащие для сбора проб морской воды, предваритель но промывали спиртом и несколько раз ополаскивали профильтрованной морской водой.

Сразу после отбора проб микропланктон концентрировали на мембранных ультрафильтрах СЫНПОР-6 (размер пор 0,4 мкм, диаметр фильтра 35 мм). Для этого собирали фильтрационную установку, состоящую из модифицированных приборов Зейтца, колб Бунзена и вакуум-насоса. Мембранные ультрафильтры непосредственно перед использованием стерилизовали кипячением (фильтры для предупреждения их скручивания помещали в подогретую до $50 - 60^{\circ}\text{C}$ дистиллированную воду и кипятили 30 мин, меняя 3—4 раза воду). Из воды фильтры вынимали пинцетом с гладкими концами и помещали в промытые спиртом приборы Зейтца, закрепляя их прижимным кольцом для предотвращения разрыва. Фильтровали при давлении $0,25 \text{ кгс} \cdot \text{см}^{-2}$. Объем профильтрованной морской воды измеряли с помощью мерного цилиндра.

В прибрежных районах океана микропланктон концентрировали из проб морской воды объемом 0,5—2 л. В олиготрофных зонах океана объем профильтрованной воды достигал 4 л. Следует, однако, помнить, что увеличение объема профильтрованной воды удлиняет время фильтрования и приводит к «метаболическому стрессу» клеток на фильтрах, перестройке их внутриклеточных нуклеотидов и снижению концентрации АТФ [6].

Экстрагирование АТФ из микропланктона. АТФ экстрагировали с помощью кипящего раствора трис-буфера (0,02 М, pH 7,5—7,7).

Для приготовления 0,02 М раствора трис-буфера взвешивали 2,42 г три-оксиметил-аминометана (молекулярная масса 121,14) и вносили его в литровую колбу. Растворяли трис в дистиллированной воде, доводили pH

до 7,7, прибавляя для этого ледяную уксусную кислоту¹, и доливали в колбу дистиллированную воду (до метки). Полученный раствор разливали по 50 мл в конические колбы и стерилизовали его в автоклаве при 1,5 атм в течение 25 мин. Хранили растворы трис-буфера в холодильнике.

Сразу после окончания фильтрации мембранные ультрафильтры переносили в химические стаканы емкостью 50 мл и с помощью подогретой пипетки прибавляли 5 мл кипящего раствора трис-буфера. Экстрагировали АТФ из микропланктона на водяной бане при температуре 100° С в течение 5 мин. Полученный экстракт переносили в стерильную мерную пробирку. Фильтр для более полной экстракции АТФ обрабатывали 2 мл кипящего раствора трис-буфера и помещали на водяную баню еще на 1—2 мин. Экстракты соединяли вместе в мерной пробирке и после охлаждения записывали их объем, затем экстракт переносили во флакон из-под пенициллина, закрывали его пробкой и закатывали алюминиевым колпачком. Полученный экстракт замораживали и хранили в судовой рефрижераторной камере при температуре — 20° С. В лабораторию для анализа пробы доставляли погруженными в сухой лед.

Приготовление препарата люциферин-люциферазы. Препарат получали из светлячков *Luciola mingrelica*. Жуков отлавливали в горных районах Северного Кавказа (конец мая — середина июля).

Светлячков замораживали в емкостях, заполненных сухим льдом, затем отделяли расположенные на конце брюшка светящиеся органы и подвергали их лиофильному высушиванию. Приготовленный препарат хранили в хорошо закрытых или запаянных флаконах при температуре — 20° С. Активность препарата сохранялась более одного года.

Перед началом анализа отбирали 20—30 светящихся сегментов, помещали их в агатовую ступку и тщательно растирали. Затем в течение часа экстрагировали люциферин-люциферазу раствором трис-буфера (не более 10 мл). Полученный экстракт центрифугировали в течение 20 мин (3000 об/мин). Раствор над осадком декантировали в стерильную пробирку и выдерживали его в холодильнике 4—5 ч для инактивации эндогенного аденозинтрифосфата. Прибавляли по 10 мл раствора $MgSO_4$ (0,05 М) и $KHAsO_4$ (0,1 М, рН 7,7)². Приготовленный препарат люциферин-люциферазы на время работы помещали в стакан со льдом.

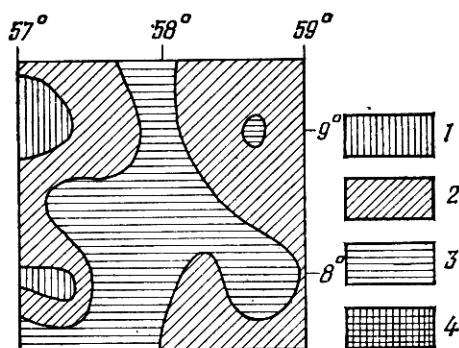
Приготовление стандартных растворов АТФ. Для этого использовали препарат динатриевую соль аденозин-5-трифосфорной кислоты (Венгрия). Навеску этого препарата массой 10 мг растворяли в 100 мл 0,02 М раствора трис-буфера. Затем разбавляли в 100 раз и получали исходный раствор, содержащий 100 нг АТФ в 1 мл. Полученный раствор служил для последовательных разбавлений и получения стандартных растворов с концентрациями 5—100 нг АТФ в 1 мл. Стандартные растворы измеряли до и после проведения серии анализов, их готовили для каждой серии анализов. Когда содержание АТФ в микропланктоне известно, достаточно приготовить стандартные растворы соответствующей концентрации. Все операции по их приготовлению выполняли на льду.

Измерение интенсивности светового потока и расчет концентрации АТФ. Интенсивность светового потока измеряли с помощью хемилюминометра «Свет». Чувствительность этого прибора достигает 10^{-14} г · мл⁻¹ пробы.

Измерение начинали с включения и прогрева хемилюминометра, регистрации фоновой величины сигнала фотоумножителя во всех рабочих диапазонах. Затем в блок смены проб помещали 10 кювет, предварительно заполненных препаратом люциферин-люциферазы (по 0,5 мл в каждой кювете). Регистрировали фоновый сигнал ферментного препарата и вводили в кювету с помощью шприца 0,5 мл стандартного раствора или опытного образца. Через 10 с приступали к измерению возникшего свечения, характеризующе-

¹ В настоящее время установлено, что анионы хлора ингибируют хемилюминесцентную реакцию и тем самым снижают световое излучение. Поэтому для установления рН раствора трис-буфера вместо применяемой ранее соляной кислоты используют уксусную [5].

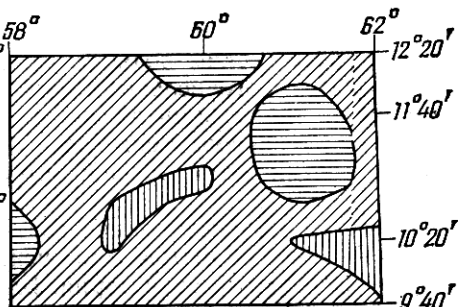
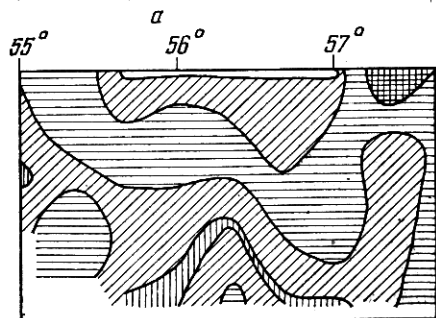
² Ионы Mg^{++} катализируют реакцию хемилюминесценции, а раствор $KHAsO_4$ увеличивает продолжительность свечения [5].



Распределение концентрации АТФ,

нг · л⁻¹:

1 — <1,0; 2 — 1,0—10,0; 3 — 10,0—30,0; 4 — 30,0—60,0. Микрополигон: а — первый, б — второй; в — полигон.



го начала реакции хемилюминесценции. Свечение регистрировали в течение 60 с на ленте самописца в форме затухающей кривой и на ленте цифropечатного устройства в виде колонок цифр. Каждый стандартный раствор или опытный образец измеряли не менее трех раз.

Существует несколько способов расчета концентрации АТФ. При условии, если между содержанием АТФ и сигналом наблюдается прямая зависимость, применяли расчетный метод (по площади под кривой, по высоким пикам на кривой или по данным цифropечати). Калибровочная кривая используется только при криволинейной зависимости между концентрацией АТФ и сигналом.

Результаты исследований. Полученные данные о содержании АТФ в микропланктоне поверхностного слоя Аравийского моря представлены на рисунке. На первом микрополигоне концентрация АТФ микропланктона изменялась от 0,13 до 20,79 нг · л⁻¹ (средняя 8,65 нг · л⁻¹). Распределение АТФ было неоднородным: в центральной части отмечалась область сравнительно высокого содержания АТФ, простирающаяся с севера на юго-запад микрополигона (рисунок, а).

На втором микрополигоне концентрация АТФ микропланктона варьировала от 0,59 до 57,35 нг · л⁻¹ (средняя 14,95 нг · л⁻¹), область со сравнительно высоким содержанием АТФ вытянулась в широтном направлении с наибольшими значениями на северо-востоке (рисунок, б).

На полигоне концентрация АТФ микропланктона составляла 0,29—22,13 нг · л⁻¹ (средняя 7,65 нг · л⁻¹). На фоне сравнительно равномерного пространственного распределения концентрации АТФ отмечались две небольшие зоны с низким и три зоны с высоким содержанием АТФ (рисунок, в).

На разрезах по 65° 20'—67° 20' в. д. концентрация АТФ микропланктона равна 2,57—56,00 нг · л⁻¹ (средняя 28,50 нг · л⁻¹).

Отмеченная неравномерность в распределении концентрации АТФ на поверхности исследованных акваторий связана с пятнистостью распределения микропланктона. Сравнительно небольшие концентрации АТФ микропланктона в Аравийском море обусловлены преобладанием детрита в отобранных пробах. Подобный факт был отмечен раньше С. Д. Миркиной [2]. По данным этого автора, концентрация АТФ поверхностного микропланкто-

на Аравийского моря колебалась от следовых количеств до $30,0 \text{ нг} \cdot \text{л}^{-1}$, в южной части Индийского океана — от $20,0$ до $250,0 \text{ нг} \cdot \text{л}^{-1}$.

В Атлантическом океане на станциях, расположенных над Срединно-Атлантическим хребтом, максимальные концентрации АТФ микропланктона (до $400,0 \text{ нг} \cdot \text{л}^{-1}$) отмечались на поверхности океана [7]. В юго-западной части Черного моря содержание АТФ микропланктона, собранного с глубины 10 м , составляло $260,0 \text{ нг} \cdot \text{л}^{-1}$.

В Тихом океане (высокопродуктивные воды перуанского района и экватора) концентрация АТФ микропланктона поверхностного горизонта составляла $514,0$ — $560,0 \text{ нг} \cdot \text{л}^{-1}$, минимальные величины ($11,0$ — $82,6 \text{ нг} \cdot \text{л}^{-1}$) наблюдались в олиготрофных водах [1]. В поверхностных водах Тихого океана (100 км от побережья Южной Калифорнии) содержание АТФ микропланктона варьировало от $90,0$ до $150,0 \text{ нг} \cdot \text{л}^{-1}$ [6], а на поверхности океана над Галапагоским поднятием составляло $155,0 \text{ нг} \cdot \text{л}^{-1}$ [9].

Анализ немногочисленных литературных данных показывает, что максимальные концентрации АТФ приурочены, как правило, к высокопродуктивным водам океана, минимальные — к олиготрофным. Таким образом, изученный нами район Аравийского моря относится к бедным районам Индийского океана.

Проведенные исследования подтвердили вывод [1, 3, 8] о пригодности использования АТФ-метода для оценки живого вещества морской воды при съемках значительных акваторий. Благодаря этому методу можно проводить бонитировку обширных акваторий для установления зон скопления живых организмов с последующими более детальными исследованиями в этих богатых жизнью районах.

1. Мельников И. А. Характеристика органических компонентов океанического сестона: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1974. — 153 с.
2. Миркина С. Д. Ферментативная активность и АТФ в водах северо-западной части Индийского океана. — Океанология, 1979, 19, вып. 4, с. 621—626.
3. Сорокин Ю. И., Люцарев С. В. Сравнительная оценка двух методов определения биомассы планктонной микрофлоры. — Там же, 1978, 18, вып. 2, с. 358—364.
4. Holm-Hansen O., Booth C. R. The measurement of adenosine triphosphate in ocean and its ecological significance. — Limnol. and Oceanogr., 1966, 11, N 4, p. 510—519.
5. Karl D. M. Adenosine triphosphate measurements in soil and marine sediments. — J. Fish. Res. Board Can., 1975, 32, N 5, p. 599—607.
6. Karl D. M., Holm-Hansen O. Methodology and measurement of adenylate energy charge ratios in environmental samples. — Mar. Biol., 1978, 48, N 2, p. 185—197.
7. Karl D. M., La Rock P. A., Morse J. W., Sturges W. Adenosine triphosphate in the North Atlantic ocean and its relationship to the oxygen minimum. — Deep-sea Res., 1976, 23, N 1, p. 81—88.
8. Karl D. M., Haugness J. A., Campbell L., Holm-Hansen O. Adenine nucleotide extraction from multicellular organisms and beach sand: ATP recovery charge ratios and determination of carbon / ATP ratios. — J. Exp. Biol. Ecol., 1978, 34, p. 163—181.
9. Karl D. M., Wersen C. O., Jannasch H. W. Deep-sea primary production at the Galapagos Hydrothermal vents. — Science, 1980, 207, p. 1345—1347.
10. McElroy W. D. The energy source for bioluminescence in an isolated system. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1947, 33, p. 342—345.

Институт биологии южных морей
им. А. О. Ковалевского АН УССР

Поступила в редколлегию
14.09.81

A. G. BENZHITSKY

AN EXPERIENCE OF ADENOSINE TRIPHOSPHATE DETERMINATION IN MICROPLANKTON OF THE ARABIAN SEA

Summary

A procedure of ATP determination in microplankton is described with due regard for recent modifications. Data on spatial distribution of the microplankton ATP in the Arabian Sea are presented.