

МОДИФИКАЦИЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ХЛОРОФИЛЛА *a* ВО ВЗВЕШЕННОМ ВЕЩЕСТВЕ ВОДОЕМОВ

Р. З. Ковалевская, А. А. Жукова, Б. В. Адамович*

УДК 543.42.062:547.979.7

Белорусский государственный университет,
220030, Минск, Беларусь; e-mail: belaqalab@gmail.com

(Поступила 6 августа 2019)

Описана модификация спектрофотометрического метода определения хлорофилла *a* в сестоне (взвешенном веществе), удобная при проведении гидроэкологических наблюдений. Предложено использовать ядерные фильтры, которые обладают рядом преимуществ по отношению к стекловолочным и насыпным фильтрам. Важное отличие от стандартных методик — применение краткосрочного (до 30 мин) высушивания ядерных фильтров с навеской в сушильном шкафу при температуре 50–55 °С сразу после осаждения сестона на фильтр. Выполнен сравнительный анализ стандартной методики и предложенной модификации для оценки содержания хлорофилла и феопигментов в лабораторных культурах водорослей (*Euglena gracilis*, *Chlorella vulgaris*) и естественном планктоне из природного водоема.

Ключевые слова: хлорофилл *a*, феопигменты, спектрофотометрический метод, взвешенное вещество.

*This article describes a modification of the spectrophotometric method for the determination of chlorophyll *a* in seston (suspended matter), which is convenient for hydroecological monitoring. It is proposed to use nuclear filters, as they have a number of advantages over fiberglass and bulk filters. An important difference of our approach from the standard methods is the use of the short-term (up to 30 min) drying of nuclear filters with seston in a desiccator at a temperature of 50–55°C immediately after the suspended matter is deposited on the filter. A comparative analysis of the assessment of the chlorophyll and phaeopigments content by the standard method and the proposed modification is carried out using the laboratory cultures of algae (*Euglena gracilis*, *Chlorella vulgaris*) and plankton from a natural water body.*

Keywords: chlorophyll *a*, phaeopigments, spectrophotometric method, suspended matter.

Введение. Одним из ключевых подходов в оценке продуктивности и экологического состояния водных экосистем является определение концентрации хлорофилла *a* (Хл *a*) — главного фотосинтетического пигмента, неотъемлемого элемента растительной клетки. Изучению процессов хлорофиллообразования, биогенеза и организации аппарата фотосинтеза в растительных организмах посвящены многочисленные работы белорусской фотосинтетической школы [1]. Из имеющихся методов определения хлорофилла — спектрофотометрических, флуометрических, хроматографических и дистанционных [2] — в гидробиологической практике благодаря простоте и доступности преимущественно применяется экстракционный спектрофотометрический метод, изначально разработанный Ричардсом и Томпсоном [3]. В дальнейшем метод совершенствовался, был рекомендован в качестве стандартного [4] и послужил основой для разработки отдельных государственных и международных стандартов [5–7].

Помимо хлорофилла в природе постоянно присутствуют продукты его трансформации (феофитины, феофорбиды и др.). При этом содержание феофитина *a* и феофорбида *a* соизмеримо с содержанием Хл *a*, что необходимо учитывать при расчете концентрации последнего. Для оценки суммарно-

MODIFICATION OF THE METHOD OF SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF CHLOROPHYLL *a* IN THE SUSPENDED MATTER OF WATER BODIES

R. Z. Kovalevskaya, H. A. Zhukava, B. V. Adamovich* (Belarusian State University, Minsk, 220030, Belarus; e-mail: belaqalab@gmail.com)

го содержания феопигментов обычно применяют методы [8, 9]. По соотношению Хл *a* и продуктов его распада можно судить о состоянии продуцентов, так как при гибели клетки фотосинтетически активный хлорофилл достаточно быстро разлагается до феофитина, изменяя при этом спектр поглощения экстракта пигментов [2, 9]. Однако ввиду того что спектральные максимумы феопигментов близки к максимумам хлорофиллов, при спектрофотометрическом измерении содержания феопигментов и “чистого” хлорофилла в общем экстракте ошибки определения могут быть существенными, а получаемые результаты лишь приблизительными [6, 10]. В настоящее время определение концентрации Хл *a* в сестоне служит обязательным элементом оценки экологического состояния водоемов, в связи с чем методическим вопросам также уделяется большое внимание [2, 10, 11].

Предлагаемая в настоящей работе модификация спектрофотометрического метода определения концентрации Хл *a* предполагает применение ядерных фильтров для концентрирования сестона, упрощение процедуры подготовки экстракта, возможность длительного хранения фильтров до проведения анализа (без существенной потери хлорофилла). Взвешивание высушенного до постоянной массы фильтра с осажденной взвесью позволяет параллельно на одних и тех же фильтрах определять содержание как хлорофилла, так и сестона в воде.

Методика исследований. Спектрофотометрический метод определения хлорофилла и его производных основан на измерении количества света, поглощаемого раствором пигментов в области спектрального максимума. Поскольку в экстракте из сестона находятся пигменты, имеющие перекрывающиеся спектры поглощения, оценка их концентраций усложняется. Так, для расчета содержания хлорофиллов *a*, *b* и *c* решается система трех уравнений с тремя неизвестными [4]:

$$\text{Chl } a = (11.64\varepsilon_{663} - 2.16\varepsilon_{645} + 0.1\varepsilon_{630})v/Vl,$$

$$\text{Chl } b = (20.97\varepsilon_{645} - 2.94\varepsilon_{663} - 3.66\varepsilon_{630})v/Vl,$$

$$\text{Chl } c = (54.22\varepsilon_{630} - 14.81\varepsilon_{645} - 5.53\varepsilon_{663})v/Vl,$$

где ε —экстинкция при соответствующих длинах волн (нм) за вычетом значений при $\lambda = 750$ нм; v — объем экстракта, мл; V — объем профильтрованной воды, л; l — длина кюветы, см. Этот подход лежит в основе стандартных методик [5—7], различия заключаются в пробоподготовке и получении экстракта пигментов. Во всех вариациях спектрофотометрического метода определения хлорофилла можно выделить несколько этапов.

Концентрирование взвеси. Используют фильтрацию воды под вакуумом или под давлением через фильтры разного рода, обычно с диаметром пор ~ 1 мкм. Чаще всего применяют насыпные мембранные [5] либо стекловолоконные [6] фильтры (Whatman GF/F) — химически инертные и обладающие высокой пропускной способностью.

Экстракция пигментов. Универсальный растворитель, пригодный для широкого спектра видового состава фитопланктона, отсутствует [11]. Наиболее часто применяют ацетон или этанол [11, 12].

Очистка экстракта. Экстракт пигментов отделяют от осадка центрифугированием или фильтрованием через фильтры с небольшими (≤ 0.4 мкм) размерами пор.

Измерение светопоглощения проводят на длинах волн, соответствующих спектральным максимумам хлорофиллов и феофитина, с коррекцией на неспецифическое светопоглощение при 750 нм [5—7].

Хранение фильтров/экстрактов. Согласно [5], рекомендуется проводить определение пигментов сразу после осаждения взвеси на фильтр. Допускается высушивание фильтров над силикагелем в эксикаторе с последующим хранением в холодильнике не более одного месяца при температуре -10 — 0 °С (в морозильной камере при температуре ниже -20 °С до трех месяцев). Подготовленные к фотометрированию экстракты пигментов допускается хранить в холодильнике при температуре 0 — 5 °С не более 1 сут. Международный стандарт [6] позволяет при необходимости хранить пробы до проведения анализа в форме экстрактов в герметичной посуде при глубокой заморозке (ниже -25 °С). Предварительно в экстрактах краткосрочным подогревом инактивируется хлорофиллаза, в присутствии которой в пробах идет разрушение хлорофилла под действием кислорода воздуха.

Особенности предлагаемой модификации методики. При концентрировании взвеси использованы ядерные фильтры — тонкие трековые мембраны различной пористости, производимые в Институте объединенных ядерных исследований (г. Дубна, Россия). Выпускаемые в виде рулона (сплошной ленты) мембраны разрезали на фильтры необходимого диаметра. В связи с высокой электростатичностью полосу рулона отматывали на лист бумаги и нарезали ее вместе с бумажной подложкой под размер фильтров. Нарезанные фильтры маркировали мягким простым карандашом, кипятили дважды по 2—3 мин в дистиллированной воде (для снижения электростатики и удаления

возможного загрязнения), затем осторожно извлекали пинцетом из воды и раскладывали на фильтровальной бумаге для высушивания в сушильном шкафу до постоянного веса.

Подготовленные для сбора сестона фильтры помещали на фильтродержатели из нержавеющей стали “Millipore” диаметром 47 мм. Насыпки не применяли. Объемы фильтруемой воды в зависимости от концентрации взвеси могут варьировать от нескольких миллилитров до нескольких литров. Сразу после фильтрации для инактивации хлорофиллазы фильтры с осадком помещали в нагретый до 50—55 °С сушильный шкаф и сушили в течение 10—30 мин (до постоянного веса). Высушенные таким образом фильтры можно хранить в герметичных светонепроницаемых контейнерах в холодильнике до проведения анализа (до 30 сут).

Ацетон, используемый для экстракции, не подщелачивали, поскольку его применение не приводило к феофитинизации хлорофилла. Фильтры с осадком сестона предварительно замачивали в небольшом объеме (3—4 мл) 90 %-ного ацетона в закрытых пробирках (устойчивых к ацетону) и выдерживали в темноте в холодильнике в течение 10—15 ч. После чего фильтр осторожно переносили пинцетом в небольшую фарфоровую ступку, где осадок на фильтрах разрушали вручную растиранием для усиления экстракции. Фильтр складывали вдвое отфильтрованной взвесью внутрь и растирали осадок утолщенной стеклянной палочкой с одной и, переворачивая, с другой стороны. Затем выливали в ступку ацетон из пробирки и осторожно ополаскивали фильтр. Полученный объем экстракта собирали стеклянным шприцем и отфильтровывали в стеклянную мерную пробирку через ядерные фильтры с размером пор 0.2 мкм с помощью микробиологических фильтродержателей “Millipore” (диаметр фильтра 13 мм). Процедуру растирания фильтра и промывания его ацетоном проводили еще дважды (добавляя каждый раз ~2—3 мл 90 %-ного ацетона), ополаскивая при этом и пробирку, в которой настаивался фильтр. Общий объем экстракта, собранного с фильтра, доводили до 10 мл. Такая процедура позволяет очищать несколько экстрактов через один и тот же фильтр. При работе с большим количеством осажденной взвеси, перифитомом или донными грунтами экстракты предварительно центрифугировались (15 мин, 5 тыс. об./мин), а затем полученный супернатант подвергался фильтрации описанным выше способом.

Концентрацию хлорофилла измеряли сразу после экстракции (возможно хранение не более 1 ч в темном прохладном месте) на спектрофотометре Cary 50 (приложение Scan), используя 1—10-см кварцевые кюветы и стандартный алгоритм расчета содержания хлорофилла [4—6]. Для последующего определения суммарного содержания феопигментов в пробе экстракты подкисляли непосредственно в кювете несколькими каплями 0.1 N раствора соляной кислоты в ацетоне и через 3—4 мин измеряли светопоглощение на 665 нм. Расчеты проводили в соответствии с методикой [8], определяющей снижение поглощения света экстрактом в красном максимуме (метод базируется на свойстве хлорофилла уменьшать оптическую плотность при 665 нм в 1.7 раза в процессе превращения в феофитин под действием слабой кислоты).

С использованием общепринятых подходов и предложенной модификации выполнен сравнительный анализ полученных результатов оценки содержания хлорофилла и феопигментов в лабораторных культурах водорослей *Euglena gracilis*, *Chlorella vulgaris* и естественном планктоне из природного водоема (Заславского водохранилища).

В каждом варианте опыта сравнение проводили в 8 повторностях. Для выявления различий между экспериментальными группами использован критерий Крускала—Уоллиса (Kruskal—Wallis rank sum test), в качестве апостериорного теста — парные множественные сравнения средних рангов (Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks (Nemenyi-Test)) [13]. Наименьший уровень значимости, при котором отличия считаются статистически значимыми: $p \leq 0.05$.

Результаты и их обсуждение. Влияние высушивания фильтров в сушильном шкафу на результаты определения содержания Хл *a* и феопигментов изучено на культурах *Euglena* и *Chlorella* (рис. 1). В качестве контроля взято содержание пигментов, экстрагированных из свежего материала сразу после осаждения пробы на фильтр. Результаты опыта на культуре *Euglena* показывают, что содержание Хл *a* без поправки на феопигменты при высушивании в течение 10 мин статистически значимо выше, чем в образцах без высушивания и с высушиванием в течение 60 мин (рис. 1, *a*). Содержание Хл *a* с поправкой на феопигменты (рис. 1, *б*) и удельное содержание феопигментов (рис. 1, *в*) не различаются. Аналогично в опытах с культурой *Chlorella* концентрация Хл *a* с поправкой и без поправки на феопигменты оказалась значительно выше ($p \leq 0.001$) при высушивании фильтров (рис. 1, *з*, *д*). Доля феопигментов при сушке существенно не изменяется (рис. 1, *е*).

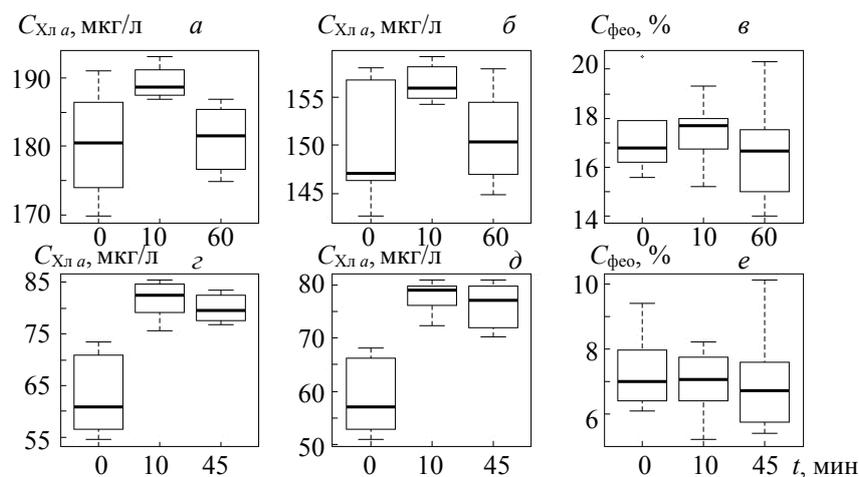


Рис. 1. Содержание Хл *a* ($C_{Хл\ a}$) без поправки на феопигменты (а, г) и с поправкой на феопигменты (б, д), удельное содержание феопигментов (в, е), измеренное сразу после фильтрации на ядерные фильтры (0) и с высушиванием в сушильном шкафу (10, 45 и 60 мин) в культурах *Euglena* (а–в) и *Chlorella* (г–е); *t* — время высушивания; верхняя и нижняя границы коробочек — квартили, линия внутри — медиана, усы — $1.5 \times \text{ИКР}$ (интерквартильный размах), точки — выбросы за его пределами

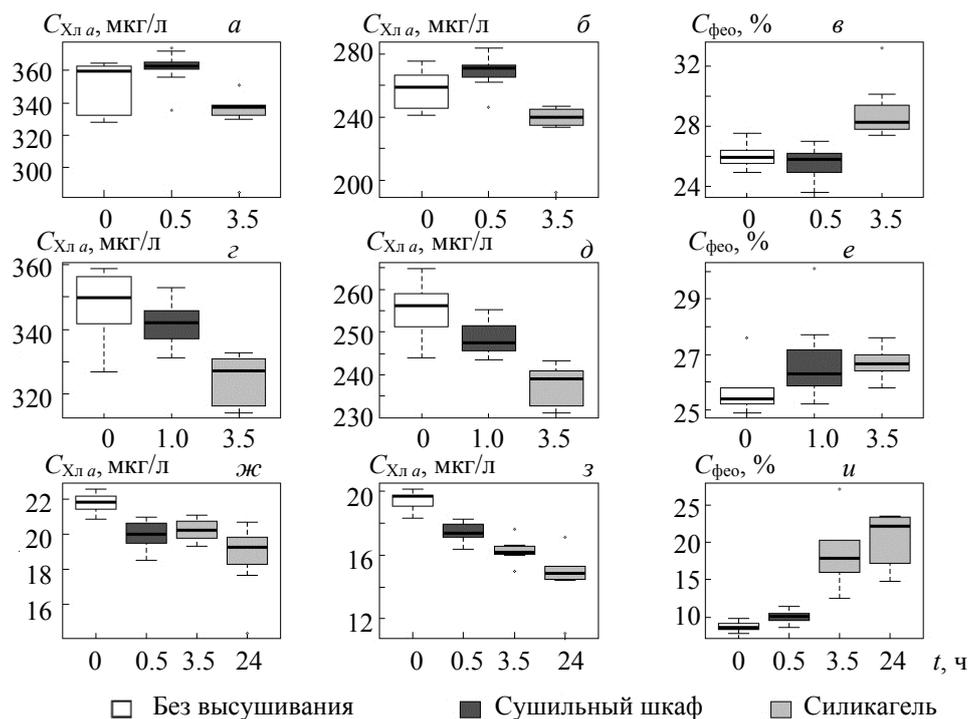


Рис. 2. Содержание Хл *a* без поправки на феопигменты (а, г, ж) и с поправкой на феопигменты (б, д, з), удельное содержание феопигментов (в, е, и) сразу после фильтрации (без высушивания), с высушиванием в сушильном шкафу и в эксикаторе над силикагелем в культуре *Euglena* на ядерных (а–в) и стекловолоконных (г–е) фильтрах, а также в сестоне Заславского водохранилища на ядерных фильтрах (ж–и); *t* — время высушивания

Эффективность применения ядерных фильтров при кратковременном нагревании подтверждается результатами определения содержания хлорофилла в лабораторной культуре *Euglena* на ядерных и стекловолоконных фильтрах, высушенных в сушильном шкафу и над силикагелем в темноте при

комнатной температуре (рис. 2). Результаты определения содержания Хл *a* с применением фильтров двух типов без высушивания практически совпадают. При высушивании с использованием силикагеля содержание Хл *a* (как с поправкой, так и без поправки на феопигменты) статистически значимо ниже, чем при высушивании в сушильном шкафу ($p \leq 0.05$). Отсутствие статистически значимых различий между фильтрами, высушенными над силикагелем, и без высушивания можно объяснить большой вариабельностью содержания Хл *a* в контроле (без высушивания). Существенных различий в доле феопигментов в трех вариантах опыта не отмечено (рис. 2, *в, е*).

При высушивании сестона Заславского водохранилища отмечено небольшое, но статистически значимое снижение содержания Хл *a* по сравнению с вариантом без высушивания (рис. 2, *ж—и*). Доля феопигментов при высушивании в сушильном шкафу не отличается от контроля (без высушивания), а при высушивании над силикагелем становится существенно выше, чем в других вариантах опыта ($p \leq 0.01$).

Результаты эксперимента по длительному хранению (36 сут) фильтров с культурой *Euglena*, высушенных в сушильном шкафу и над силикагелем, показывают, что содержание Хл *a* при хранении снижается при обоих вариантах высушивания (рис. 3). Не отмечено статистически значимого снижения $C_{Хл a}$ при хранении как ядерных (рис. 3, *а—в*), так и стекловолоконных (рис. 3, *з—е*) фильтров, высушенных в сушильном шкафу. В то же время для высушенных над силикагелем фильтров содержание Хл *a* снижается (рис. 3, *а, б, з, д*), а доля феопигментов статистически значимо возрастает (рис. 3, *в, е*) в сравнении с другими вариантами.

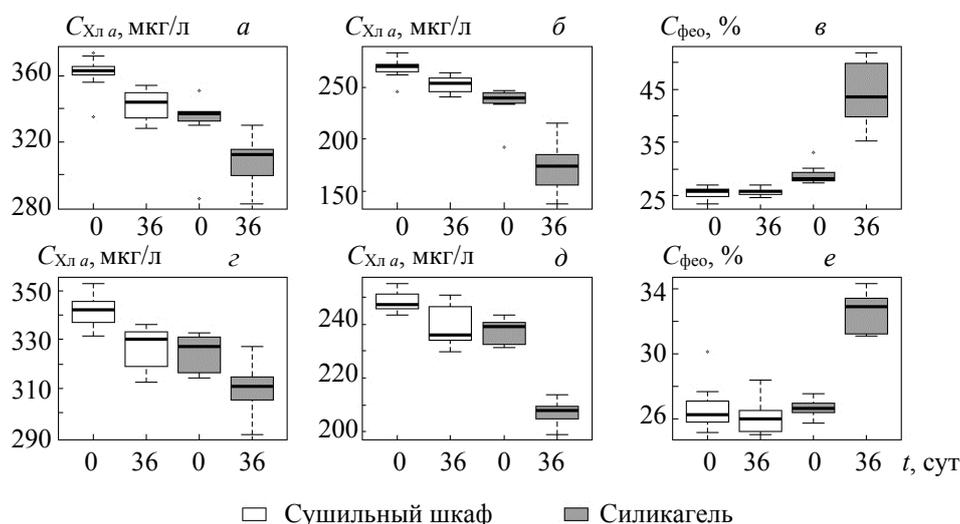


Рис. 3. Содержание Хл *a* без поправки на феопигменты (*а, з*) и с поправкой на феопигменты (*б, д*), удельное содержание феопигментов (*в, е*) в культуре *Euglena* на ядерных (*а—в*) и стекловолоконных (*з—е*) фильтрах с высушиванием в сушильном шкафу и над силикагелем без хранения (0) и спустя 36 сут; *t* — время хранения

Возможность хранения ядерных фильтров с осажденной на них и высушенной в сушильном шкафу хлорофиллсодержащей взвесью испытана на срок 10, 20 и 30 сут (рис. 4). Результаты исследований на культуре *Euglena* (рис. 4, *а—в*) показывают, что хранение в течение 20 и 30 сут приводит к небольшому (<7%), но статистически значимому снижению содержания Хл *a* как без поправки, так и с поправкой на феопигменты. При хранении в течение 10 сут различий не выявлено. С увеличением сроков хранения вариабельность содержания феопигментов в исследуемых образцах возрастает.

В отличие от культуры *Euglena* эксперимент с культурой *Chlorella* (рис. 4, *з—е*) показывает отсутствие статистически значимой разницы содержания Хл *a* между вариантами после высушивания в сушильном шкафу и хранения в течение 10—30 сут. Значимые отличия отмечены между вариантом без высушивания и всеми остальными, причем даже после хранения содержание Хл *a* без поправки на феопигменты выше, чем при определении сразу без высушивания. Доля феопигментов несколько возрастает с увеличением срока хранения, но статистически значимая разница отмечена только между вариантами с высушиванием и хранением в течение 20 сут (рис. 4, *е*).

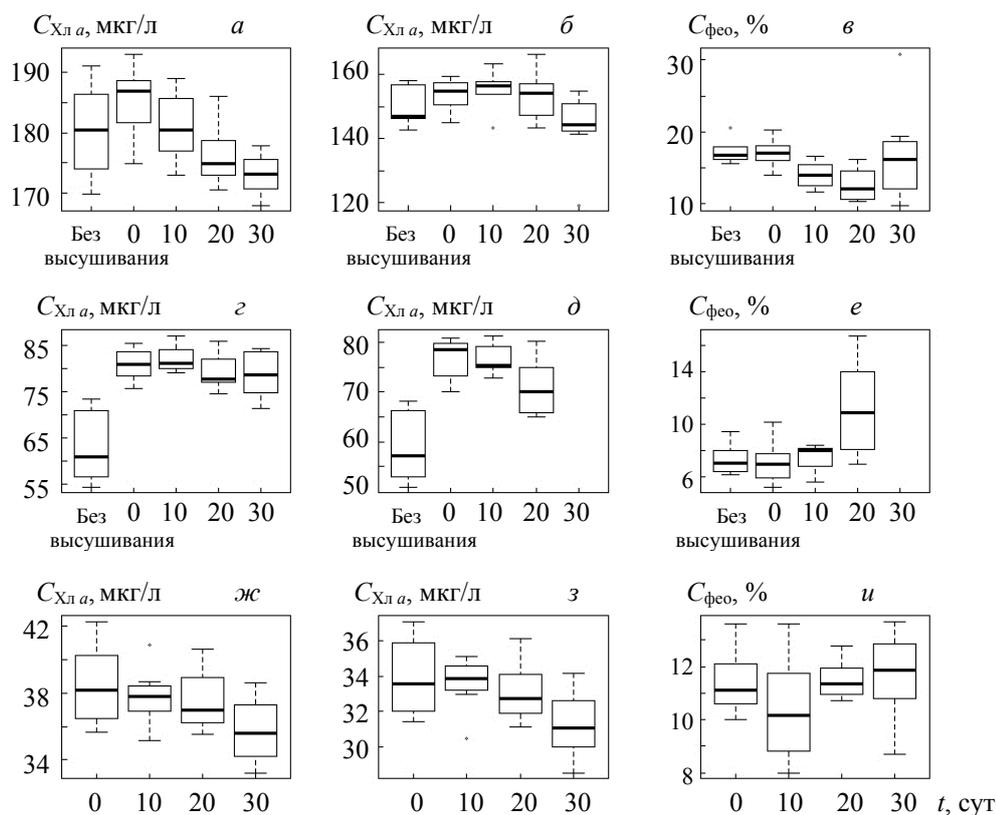


Рис. 4. Содержание Хл *a* без поправки на феопигменты (*a*, *г*, *ж*) и с поправкой на феопигменты (*б*, *д*, *з*), удельное содержание феопигментов (*в*, *е*, *и*) в культурах *Euglena* (*a–в*) и *Chlorella* (*г–е*) и в сестоне Заславского водохранилища (*ж–и*) после фильтрации на ядерные фильтры без высушивания, а также с высушиванием в сушильном шкафу без хранения (0) и последующим хранением в течение 10, 20 и 30 сут; *t* — время хранения

Эксперимент с фильтрацией и хранением на ядерных фильтрах сестона Заславского водохранилища показывает отсутствие в течение 20 сут хранения заметных отличий по содержанию Хл *a* с поправкой и без поправки на феопигменты. Статистически значимое снижение отмечено только на 30-е сут ($p \leq 0.05$), при этом падение концентрации Хл *a* по отношению к варианту без хранения составило 7 % при расчете без поправки на феопигменты, с поправкой — 8 %. Значимой разницы в удельном содержании феопигментов в природном сестоне при хранении ≤ 30 сут не обнаружено.

В рассматриваемой модификации спектрофотометрического метода для концентрирования сестона предлагается применять ядерные фильтры. Использование насыпных фильтров, рекомендуемых стандартными методиками [5], связано с определенными проблемами: трудоемкостью подготовки насыпок (CaCO_3 , MgCO_3 , BaCO_3), неудобством их использования в полевых условиях, сложностью последующего осветления экстракта при центрифугировании и возможной сорбцией пигментов в осадке. При использовании стекловолоконных фильтров [6] также возникают трудности осветления экстракта и сорбция пигментов в осадке при центрифугировании. Применение ядерных фильтров в предлагаемой модификации практически исключает указанные неудобства. Преимущество ядерных фильтров — их инертность в растворителях и высокая прочность. Высыхание до постоянного веса на ядерных фильтрах в сушильном шкафу происходит быстро (до 20–30 мин), следовательно, возникает возможность совмещения определения концентрации сестона гравиметрическим методом с последующей экстракцией Хл *a*. Как показал наш опыт, предварительно взвесив тарированный чистый фильтр, а затем фильтр с осадочной высушенной взвесью, с успехом можно совместить определение концентрации сестона и последующий анализ содержания пигментов в его составе. Следует отметить, что при указанном режиме высушивания фильтров с осадком разрушения пигментов в сестоне не наблюдается. Высушивание фильтров с осадком в предварительно нагретом

до 50—55 °С сушильном шкафу предпочтительнее по сравнению с сушкой в эксикаторе над силикагелем. В результате высушивания как ядерных, так и стекловолоконных фильтров над силикагелем наблюдается более значительное снижение содержания Хл *a* относительно контроля, чем в варианте с сушкой в шкафу. Кратковременная сушка фильтров в сушильном шкафу останавливает феофитинизацию проб за счет инактивации хлорофиллазы, а также закрепляет клетки водорослей на фильтре, способствуя более эффективной экстракции пигментов из них при растирании.

Как видно из рис. 5, для двух культур водорослей и природного планктона характер спектров поглощения экстрактов во всей видимой области и положение основных максимумов до и после высушивания не изменяются, т. е. кратковременное нагревание не приводит к разрушению Хл *a* и позволяет определять его концентрацию в пробе на момент фильтрации нативного образца.

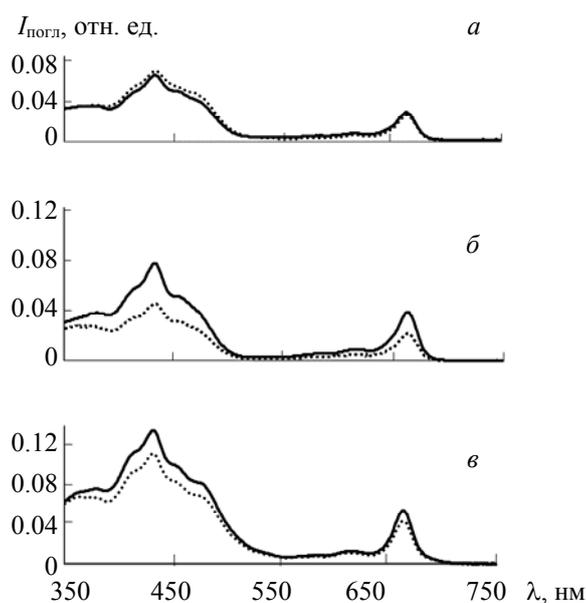


Рис. 5. Спектры поглощения экстракта пигментов в ацетоне в культуре *Euglena* (а), *Chlorella* (б) и природном планктоне (в) без сушки (пунктир) и после высушивания в сушильном шкафу в течение 30 мин (сплошная линия)

Различия в степени извлечения Хл *a* при сушке связаны с видовыми различиями водорослей. Экстракция из клеток *Euglena* с тонким перипластом происходит легко без дополнительного разрушения, а для клеток *Chlorella*, имеющих прочную оболочку, дополнительное механическое разрушение имеет значение. При этом в ходе экстракции без высушивания клетки *Chlorella* на влажном фильтре закрепляются слабо и хуже подвергаются механическому разрушению, что приводит к менее полному извлечению пигментов. В процессе высушивания клетки “прилипают” к фильтру и растирание осадка становится более результативным.

Узким местом экстракции является сложность полного извлечения Хл *a* из пресноводного планктона [10]. Лучшим экстрагентом считается метанол, который редко используется ввиду его токсичности. Экстракция пигментов этанолом и ацетоном дает сопоставимые результаты [2, 4, 10]. Методика [5] рекомендует не допускать при обработке проб нагрева >40 °С ввиду разрушения Хл *a* при повышении температуры. Напротив, в соответствии с [6, 7] процедура экстракции пигментов проводится горячим этанолом (нагрев при 75 °С в течение 5 мин) для инактивации хлорофиллазы и предотвращения деградации хлорофилла. В настоящей работе использована экстракция ацетоном, и для усиления полноты экстракции пигментов осадок на фильтрах разрушали вручную растиранием. Все методики указывают на то, что в ходе экстракции пробы не следует подвергать воздействию яркого света во избежание фотодеградации хлорофилла [4—6, 10].

Относительно влияния условий и длительности хранения проб на репрезентативность получаемых результатов единое мнение отсутствует. Методики сходятся лишь в недопустимости хранения замороженных проб воды для последующего анализа [4—7]. Наши данные показывают, что фильтры с навеской после высушивания в сушильном шкафу можно хранить в холодильнике до 30 сут без су-

щественного изменения содержания хлорофилла и феопигментов (см. рис. 4). Длительное хранение высушенных в шкафу фильтров не сопровождается значительным снижением содержания хлорофилла (<10 %), а для высушенных над силикагелем приводит не только к более значительному снижению количества хлорофилла, но и к росту феофитинизации.

Заключение. Предложенная модификация спектрофотометрического метода определения концентрации хлорофилла *a* во взвешенном веществе водоемов отличается от стандартной методики по двум основным позициям. Во-первых, используются ядерные фильтры, которые обладают рядом существенных преимуществ: они не сорбируют взвесь, устойчивы к ацетону, не рвутся при растирании, не коробятся при нагревании. Во-вторых, применяется краткосрочное высушивание фильтра в сушильном шкафу сразу после осаждения сестона на фильтр.

Показано, что кратковременное (в течение 10—30 мин) высушивание фильтров с навеской в сушильном шкафу при температуре 50—55 °С не ведет к потере хлорофилла по сравнению с вариантом без высушивания; количество хлорофилла *a* при осаждении взвеси на фильтры близкой пористости (ядерных (1.0 мкм) и стекловолоконных (GF/F 0.7 мкм)) сопоставимо; высушивание фильтров с осадком в предварительно нагретом сушильном шкафу предпочтительнее по сравнению с сушкой в эксикаторе над силикагелем, так как быстро инактивирует хлорофиллазу и не приводит к феофитинизации проб; после высушивания в сушильном шкафу фильтры с навеской можно хранить в холодильнике до 30 сут без существенного изменения содержания хлорофилла и феопигментов.

Предложенная модификация спектрофотометрического метода определения концентрации хлорофилла *a* во взвешенном веществе позволяет одновременно определять содержание сестона на тех же фильтрах и хранить высушенные фильтры при необходимости до одного месяца, поэтому ее можно рекомендовать для гидроэкологических наблюдений.

Авторы выражают благодарность рецензентам за их конструктивные комментарии по существу работы.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Б18-087).

- [1] **Н. Г. Аверина, Л. Ф. Кабашникова, Н. В. Шалыго, И. Д. Волотовский.** Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук, **63**, № 2 (2018) 248—256
- [2] **J. Neveux, D. Delmas, J.C. Romano, P. Algarra, L. Ignatiades, A. Herbland, P. Morand, A. Neori, D. Bonin, J. Barbe, A. Sukenik, T. Berman.** Marine Microbial Food Webs, **4**, N 2 (1990) 217—238
- [3] **F. A. Richards, T. G. Thompson.** J. Marine Res., **11** (1952) 156—172
- [4] SCOR-UNESCO Working group N 17. Determination of Photosynthetic Pigments in Sea-water. Monographs on Oceanologic Methodology, Paris, UNESCO (1966) 9—18
- [5] ГОСТ 17.1.04.02.90. Вода. Методика спектрофотометрического определения хлорофилла-*a*, Москва (1999) 3—12
- [6] ISO 10260:1992, Water quality – Measurement of Biochemical Parameters – Spectrometric Determination of the Chlorophyll-*a* Concentration (1992) 1—6
- [7] СТБ 17.13.05-34-2014/ISO 10260:1992. Вызначэнне канцэнтрацыі хларафіла-*a* спектрафотаметрычным метадам, Мінск (2014) 1—9
- [8] **C. J. Lorenzen.** Limnol. Oceanogr., **12** (1967) 343—346
- [9] **B. Moss.** Limnol. Oceanogr., **12** (1967) 340—342
- [10] **Л. Е. Сигарева.** Методические вопросы изучения первичной продукции планктона внутренних водоемов, СПб, Гидрометеиздат (1993) 75—85
- [11] **R. J. Ritchie.** Photosynthetica, **46**, N 1 (2008) 115—126
- [12] **A. F. H. Marker, E. A. Nusch, H. Rai, B. Riemann.** Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol., **14** (1980) 91—106
- [13] **T. Pohlert.** The Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package (PMCMR). R package (2014) 1—9