

А.П.САДЧИКОВ

**МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ПРЕСНОВОДНОГО
ФИТОПЛАНКТОНА**



Москва - 2003

МОСКОВСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
«МОСВОДОКАНАЛ»
МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. М.В.ЛОМОНОСОВА
МЕЖДУНАРОДНЫЙ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР МГУ
КАФЕДРА ГИДРОБИОЛОГИИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА МГУ

А.П.САДЧИКОВ

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ПРЭСНОВОДНОГО ФИТОПЛАНКТОНА



**(к 250-летию Московского государственного университета
им. М.В.Ломоносова)**

Москва - 2003

УДК 577.614.7
ББК 28.082Я73
К88

Рецензенты:

заместитель начальника лаборатории Рублевской водопроводной станции

Т.В.Витвицкая

заместитель начальника лаборатории Зоны санитарной охраны **П.В.Басихин**

инженер 1 категории лаборатории Восточной водопроводной станции

В.Б.Лукин

ведущий инженер Отдела Главного технолога Управления водоснабжения

МГП «Мосводоканал» **Г.П.Кашкарова**

К88

**Методы изучения пресноводного фитопланктона:
методическое руководство: автор-сост. Садчиков А.П.
– М.: Изд-во "Университет и школа", 2003. – 157 с.**

Методическое пособие подготовлено по заданию МГП «Мосводоканал» для его использования в лабораториях слежения за развитием гидробионтов в водоемах системы питьевого водоснабжения.

Руководство содержит описание методов изучения пресноводного фитопланктона: отбор проб и количественный учет водорослей, определение биомассы по их численности и концентрации хлорофилла, изучение физиологического состояния водорослей. Описаны методы определения продукции фитопланктона кислородным, радиоуглеродным и хлорофильным методами.

Большое внимание уделено оценке степени загрязнения вод по показательным организмам, вычислению сапробности биоценозов; приведены различные формулы для вычисления индексов видового разнообразия организмов и сходства сообществ.

Рассмотрены проблемы эвтрофирования водоемов, участие водорослей в этом процессе.

Книга представляет интерес для работников системы питьевого водоснабжения, гидробиологов, экологов, рыбоводов, специалистов по охране окружающей среды, преподавателей вузов, студентов.

Рис. 14, табл. 2, библиогр. 88 названий.

ISBN 5-94391-015-8

© Садчиков А.П., 2003

© МГП «Мосводоканал», 2003

ВВЕДЕНИЕ

Мир водорослей огромен и разнообразен. Практически невозможно найти место, где бы ни встречались эти растения. Способность водорослей обитать в разнообразных условиях уникальна. Они живут в дождевой воде с минимальным количеством солей и в гиперсоленых озерах, на высокогорных льдах и поверхности раскаленных скал.

Благодаря широкому распространению водоросли имеют большое значение в жизни других организмов, играют важную роль в биотическом круговороте и занимают значительное место в хозяйственной деятельности человека. Водоросли морских и пресных водоемов являются основной пищей планктонных и бентосных животных, в том числе и некоторых рыб.

Развитие фитопланктона определяет общий уровень биологической продуктивности водоема, в том числе и рыбопродуктивности. В то же время «цветение» водорослей отрицательно сказывается на качестве воды, снижает возможность рекреационного использования водоемов. Поэтому изучение водорослей крайне важно для понимания процессов, протекающих в водоемах.

Методическое руководство подготовлено по заданию МГП «Мосводоканал» для его использования в лабораториях слежения за развитием гидробионтов в водоемах системы питьевого водоснабжения. В нашей работе мы попытались обобщить литературные данные разных авторов и собственные исследования для их использования в практической работе. Методическое руководство составлено на основе оригинальных работ отечественных и зарубежных специалистов – Г.Г.Винберга, И.А.Киселева, Г.В.Кузьмина, А.В.Макрушина, Н.П.Масюк, Т.М.Михеевой, И.Л.Пыриной, Л.А.Сиренко, А.В.Топачевского, И.С.Трифоновой, В.Д.Федорова и многих других.

Данное руководство не может претендовать на полноту анализа всех методов изучения фитопланктона, т.к. объем книги не позволяет это сделать. В работе затронуты только основные подходы и методы изучения фитопланктона. Тем не менее, надеемся, что методическое пособие окажется полезным не только для практических работников, но и всех тех, кто интересуется вопросами экологии водных сообществ.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Водоросли, как и говорит само название этой группы организмов, - растения, обитающие в воде. Однако этот термин страдает большой неопределенностью, так как включает в себя все растения, живущие в воде, т.е. все водные семенные растения (ряска, элодея, рдест, уруть и др.), высшие споровые растения (мхи, папоротникообразные) и, конечно, типичные водоросли. К первым двум группам водных растений обычно применяют термины «гидрофиты», что говорит о месте их обитания, или «макрофиты», т.е. большие растения. Последний термин включает в себя и некоторые типичные водоросли (харовые, бурые, красные), а иногда и нитчатые зеленые водоросли.

В ботанике термин «водоросли» используют в более узком смысле. К ним относят низшие, лишённые расчленения на стебель и листья, обычно водные фотосинтезирующие растения. Однако значительная часть водорослей встречается и на суше: на поверхности и в приповерхностном слое почвы, на скалах, стволах деревьев. Жизнь этих растений связана с водой, однако они могут легко переносить высыхание, промерзание и очень быстро оживают при малейшем увлажнении. Стоит только появиться достаточному количеству влаги, как поверхность некоторых предметов сразу же покрывается зеленым или красным (в зависимости от видового состава водорослей) налетом. Некоторые водоросли даже обитают в качестве симбионтов внутри организма животных. Есть виды водорослей, встречающиеся во льдах и горячих источниках. Таким образом, термин «водоросли» представляет собой скорее экологическое понятие, означая жизненную форму растительных организмов, объединенных в одну группу образом жизни.

Тело водорослей - слоевище или таллом (от греч. «таллос» - молодая ветка, побег) - по своему строению значительно проще, чем у мхов, папоротников и других наземных растений; часто отсутствует дифференциация клеток на ткани. Есть водоросли неклеточного строения (ботридиум, сифоновые). Клеточная оболочка состоит из целлюлозы, пектиновых веществ, кремнийорганических соединений (у диатомовых), альгина и фуцина (у бурых водорослей). Иногда оболочка интенсивно пропитывается (инкрустируется) солями железа (у вольвоксовых, десмидиевых) или кальция (у красных водорослей), что нередко создает структуры в виде панциря.

Оболочки могут пропитываться также органическими соединениями (лигнин, кутин). В качестве запасных веществ представлены липиды, гликоген, крахмал, волютин, различные полисахариды. Споры - органы размножения водорослей, - как правило, лишены твердой оболочки.

На основании различий в строении клетки (ядерного аппарата, набора пигментов, клеточной оболочки, запасных веществ и др.) различают прокариотические и эукариотические водоросли. У прокариотов (от лат. «про» – перед, раньше, вместо и греч. «карион» – ядро) клетки не имеют ограниченного мембраной ядра. К ним относятся все бактерии и синезеленые водоросли (или же *Cyanobacteria* – цианобактерии). У эукариотов (от греч. «эу» – хорошо, полностью и «карион» – ядро) клетки содержат оформленное ядро. К эукариотам относятся все высшие животные и растения, а также одноклеточные и многоклеточные водоросли, грибы и простейшие.

Водоросли объединены в 13 отделов, названия которых, в основном, совпадают с характером их окраски, а у некоторых – и с особенностями строения (Вассер и др., 1989):

Прокариотические водоросли (Procaryota):

1. Синезеленые водоросли (*Cyanophyta*);
2. Прокариотические (первичные) зеленые водоросли (*Prochlorophyta*).

Эукариотические водоросли (Eukaryota):

1. Эвгленовые водоросли (*Euglenophyta*);
2. Динофитовые водоросли (*Dinophyta*);
3. Криптофитовые водоросли (*Cryptophyta*);
4. Рафидофитовые водоросли (*Raphidophyta*);
5. Золотистые водоросли (*Chrysophyta*);
6. Диатомовые водоросли (*Bacillariophyta*);
7. Желтозеленые водоросли (*Xanthophyta*);
8. Красные водоросли (*Rhodophyta*);
9. Бурые водоросли (*Phaeophyta*);
10. Зеленые водоросли (*Chlorophyta*);
11. Харовые водоросли (*Charophyta*).

Несмотря на то, что история изучения водорослей насчитывает несколько столетий, среди специалистов все еще нет единого мнения относительно положения их в общей классификации. Это в первую очередь относится к синезеленым и ко всем тем водорослям, которые снабжены органами движения, - жгутиками (почти все Euglenophyta, большая часть Dinophyta, отдельные классы Xanthophyta, Chlorophyta).

Синезеленые и прокариотические зеленые водоросли относят к прокариотам (т.е. к неядерным организмам), так как их клетки лишены оформленного ядра.

Отдел прокариотические (первичные) зеленые водоросли выделен в отдельную группу совсем недавно (1976 г.) после описания одного рода *Prochloron* и одного входящего в него вида *P. didemni* (Lewin). Эта группа водорослей занимает промежуточное положение между прокариотами - бактериями и синезелеными водорослями, с одной стороны, и эукариотами (ядерными организмами) - зелеными водорослями. С бактериями их роднит отсутствие оформленного ядра, с синезелеными - отсутствие ядра и способность к фотосинтезу, с зелеными - наличие хлорофилла «b». Различными исследователями вопрос о систематической определенности этой малочисленной группы водорослей решается по-разному, в зависимости от взятого за основу критерия.

В последнее время синезеленые водоросли *Cyanophyta* стали относить к бактериальным, а не к растительным организмам по ряду признаков (в ботанической литературе чаще всего используется термин «синезеленые водоросли», а в микробиологической – «цианобактерии»). У *Cyanophyta*, в отличие от эукариот, нет оформленного ядра, что сближает их с другими прокариотами, основу клеточных стенок составляет гликопептид муреин, половой процесс или отсутствует, или протекает по типу конъюгации, т.е. слияния протопластов двух вегетативных клеток.

Жгутиковые формы имеют признаки как растений, так и животных, что послужило поводом для объединения их всех в общую систематическую группу «Жгутиковых организмов» и включения их в систему животного мира. В отличие от животных-жгутиконосцев, водоросли имеют хлорофилл и хроматофоры (от греч. «хрома»- цвет, «форео» - несу). Однако в темноте они могут утрачивать пигменты, становятся бесцветными и существуют за счет поглощения растворенных в воде

органических веществ. Некоторые виды одноклеточных водорослей (из Dinophyta) способны, подобно простейшим, захватывать органические частицы.

Наука, изучающая водоросли, - **альгология** (от лат. «альга» - водоросли, «логос» - наука) - рассматривает вопросы систематики, морфологии, физиологии, экологии водорослей и их практическое значение.

Альгология является одним из разделов ботаники, тесно связана с микробиологией и гидробиологией.

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ВОДРОСЛЕЙ

Строение водорослей чрезвычайно разнообразно. Если высшие растения целиком и полностью характеризуются листостебельным типом строения, то дифференциация тела водорослей на какие-либо отделы отсутствует. Для них характерно одноклеточное, колоннальное, многоклеточное и неклеточное строение. Размеры в пределах каждой из этих форм могут варьировать в широких пределах. Так, например, некоторые виды одноклеточных синезеленых и зеленых водорослей - синехоцистис (*Synechocystis* sp.) и хлорелла (*Chlorella* sp.) - могут быть размером 1-5 мкм. В то же время длина отдельных клеток зеленой колоннальной водоросли гидродиктион (*Hydrodictyon* sp.) достигает 1,5 см, а клеток, образующих междоузлия в стеблевидных талломах харовых водорослей - 15-20 см. Однако самыми крупными размерами обладают многоклеточные морские бурые водоросли, в частности макроцистис (*Macrocystis* sp.), мощные слоевища которого иногда достигают длины 60-80 м.

Огромное многообразие внешнего облика водорослей может быть сведено к нескольким структурам, повторяющимся в разных систематических группах. Это свидетельствует об известном параллелизме эволюционного развития в пределах этих отделов.

В настоящее время различают 9 основных типов морфологической структуры тела водорослей. Из них 4 относятся к одноклеточным формам, 1 - к неклеточным, а остальные 4 - к многоклеточным.

1. **Монадная** (жгутиковая) (от греч. «монас» – одинокий) структура широко

распространена среди водорослей. Она свойственна одноклеточным и колониальным организмам с плотной клеточной оболочкой (либо лишенным ее) и характеризуется наличием одного, двух, трех, четырех или многих жгутиков, с помощью которых они передвигаются в толще воды. Особенности строения жгутиков в разных отделах водорослей представлены в таблице 1. Монадная структура встречается у многих представителей отделов динофитовых (порядок Peridinales), эвгленовых (порядок Euglenales), золотистых (порядок Chromulinales), криптофитовых (порядок Cryptomonadales), желтозеленых (порядок Heterochloridales) и зеленых (порядок Volvocales) водорослей, причем у первых четырех она является преобладающей.

В пределах монадной структуры встречаются колониальные формы, представляющие собой скопления отдельных клеток монадного строения, объединенных слизью в единое целое.

У многих водорослей во всех отделах, за исключением Cyanophyta и Rhodophyta, монадным строением обладают подвижные клетки, служащие для бесполого (зооспоры) и полового (гаметы) размножения. При половом размножении подвижными чаще всего бывают мужские гаметы, а в некоторых случаях и женские.

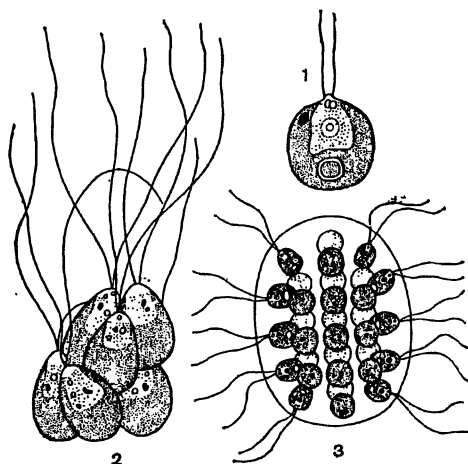


Рис. 1. Монадная структура у водорослей

1 – одиночная клетка *Chlamydomonas*; 2 – колония *Pyrobotrus*, образованная срастанием клеток; 3 – колония *Eudorina*, образованная слизью.

2. **Амебодная (ризоподияльная) структура** представлена у одноклеточных и колониальных водорослей, лишенных плотной оболочки, постоянной формы тела и жгутиков. Эти организмы передвигаются как амебы, при помощи псевдоподий (от греч. «псевдос» - ложный, «подиос» - нога), которые бывают разной формы. Если они длинные и тонкие, тогда их называют ризоподиями (от греч. «риза» - корень, «подиос» - нога). Иногда несколько клеток подобного строения соединяются своими ризоподиями и даже сливаются в плазмодии.

Амебодная структура свойственна представителям динофитовых (порядок Dinamoebidiales), золотистых (порядок Chrysamoebales) и желтозеленых водорослей (порядок Rhizochloridales), однако амебодную структуру временно могут приобретать некоторые одноклеточные водоросли, лишенные плотной оболочки и обладающие жгутиками, путем их сбрасывания или втягивания (Heterochloris).

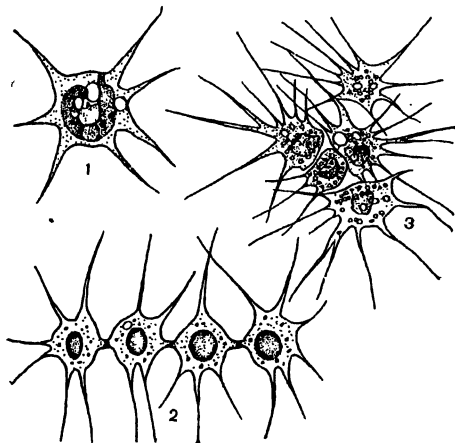


Рис. 2. Амебодная структура у водорослей

1 – одиночные клетки *Chrysamoeba*; 2 – рядовое объединение клеток *Chrysidiastrum*; 3 – групповое объединение клеток *Rhizochrysis*.

3. **Коккоидная структура** (от греч. «коккос» - зерно) наблюдается у одноклеточных и колониальных водорослей, характеризуется наличием у клеток в вегетативном состоянии плотной оболочки. Водоросли коккоидной структуры

неподвижны в вегетативном состоянии, лишены жгутиков и псевдоподий. Исключение составляют диатомовые и десмидиевые, обладающие способностью к активному передвижению благодаря выделению слизи протопластами их клеток. Коккоидная структура широко распространена почти во всех отделах эукариотических водорослей (за исключением динофитовых, криптофитовых, где она редка, эвгленофитовых и хлоромонадофитовых, где она отсутствует), а также у синезеленых. У желтозеленых она является преобладающей, а у диатомовых – единственной формой строения тела. Вследствие такого строения водоросли коккоидной структуры не способны к активному движению; они или пассивно переносятся водой, или прикрепляются к субстрату. Форма таких клеток чрезвычайно разнообразна - от простой шаровидной до самой причудливой; оболочка у них гладкая или с различными выростами, цельная или пористая и т. д. Многим водорослям коккоидной структуры свойственен процесс образования колоний различной формы, со слизью или без нее.

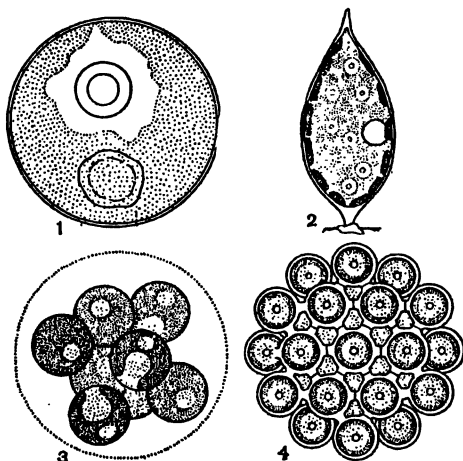


Рис. 3. Коккоидная структура у водорослей

1 – одиночная клетка *Chlorococcum*; 2 – одиночная клетка *Characium*; 3 – колония *Sphaerocystis*, образованная слизью; 4 – колония *Coelastrum*, образованная срастанием клеток.

4. Пальмеллоидная (капсальная) структура представлена колониальными

и одноклеточными неподвижными водорослями, погруженными в общую слизь определенной формы, чаще всего прикрепленными к субстрату. Клетки объединяются в этой слизи чисто механически и плазматических связей не имеют. Пальмеллоидная структура характерна для зеленых (порядок *Tetrasporales*), золотистых (порядок *Chrysocapsales*), желтозеленых (порядок *Heterogloales*). В других отделах она встречается реже или вообще отсутствует. О пальмеллоидной структуре (от греч. «пальмелос» – трепетание) говорят лишь в том случае, когда она является постоянной формой вегетативного роста водорослей. Если же это только временная стадия, то ее называют пальмеллоидным состоянием. В пальмеллоидное состояние могут временно переходить многие одноклеточные водоросли и чаще всего при неблагоприятных условиях. Образующиеся при этом слизистые тела не достигают крупных размеров и не имеют определенной формы.

4. **Нитчатая (трихальная) структура** представлена клетками водорослей, соединенными в колонии в виде нити. Нити могут быть простыми и разнообразно ветвящимися. Водоросли, обладающие такой структурой, бывают как свободнодвижимыми, так и прикрепленными. Клетки в нитчатых слоевищах тесно связаны друг с другом. Во многих случаях у них доказано существование пор и плазмодесм (от греч. «плазма» - вылепленное, оформленное, «десмос» - связь), проходящих через поперечные клеточные перегородки и связывающие протопласты соседних клеток в единый целостный организм. Вместе с тем, при вегетативном размножении многих нитчатых водорослей часто происходит распадение нитей на участки и даже на отдельные клетки.

В наиболее простых случаях талломы нитчатой структуры слагаются из одного ряда похожих друг на друга клеток, образующихся в результате вегетативного деления. Наряду с этим, у многих водорослей нити на конце утончаются или расширяются, или имеют конечные клетки, отличающиеся по форме от остальных. Различия в строении концов нити наиболее отчетливы при прикрепленном образе жизни. При этом нередко нижняя клетка превращается в бесцветный ризоид (от греч. «риза» - корень, «эйдос» - вид) или стопу, лишенную хлоропластов. Рост нитчатых талломов осуществляется благодаря вегетативному делению клеток. Если способностью делиться обладают все клетки нити, то такой

тип роста называют **диффузным**. Если же делятся не все клетки, то в зависимости от положения зоны роста на нити различают **интеркалярный (вставочный)** (если зона роста расположена в средней части нити), **апикальный** (рост осуществляется делением преимущественно верхних конечных клеток) и **базальный** рост (за счет деления клеток, расположенных у основания нити). Нитчатая структура чаще всего

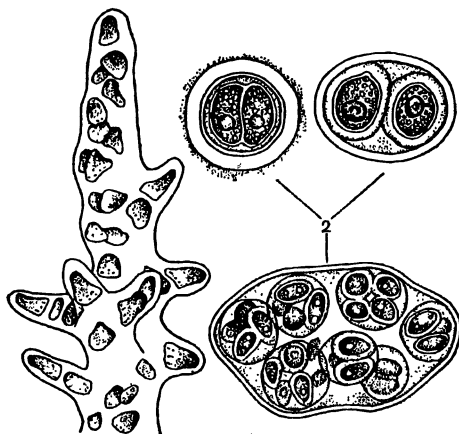


Рис. 4. Пальмеллоидная структура и пальмеллоидное состояние
 1 - пальмеллоидная структура у золотистой водоросли *Hydrurus* (часть таллома); 2 - пальмеллоидное состояние у зеленой водоросли *Chlamydomonas*.

встречается у синезеленых (порядок *Oscillatoriales*), зеленых (порядок *Ulothrichales*), красных (*Goniotrichales*). Нередко встречается у желтозеленых водорослей, значительно реже - среди золотистых (порядок *Phaeothamniales*) и динофитовых (порядок *Dinotrichales*).

5. **Разнонитчатая (гетеротрихальная)** структура (от греч. «гетерос» - другой, иной, «трихос» - волос) представляет собой усложненный вариант нитчатого строения. Для нее характерны две системы нитей: стелющиеся по субстрату и отходящие от них вертикальные нити. Последние - обычно выполняют ассимиляторную функцию. В некоторых случаях горизонтальная часть состоит из ветвящихся нитей, обычно тесно расположенных, или полностью смыкающихся в сплошную **псевдопаренхиматическую** (от греч. «псевдос» - ложь, «паренхима» -

буквально - налитое рядом) клеточную пластинку, нарастающую по периферии и уже не имеющую следов нитчатого строения. Вертикальную часть образуют одна или многие, часто ветвящиеся нити, на которых обычно развиваются органы размножения.

В результате вторичных изменений - редукции или чрезмерного развития одной из этих частей - происходит полная утрата характерных черт разнонитчатого строения. Слоевище приобретает форму прикрепленного к субстрату диска (при редукции вертикальных нитей) или сильно развитых вертикальных нитей (при редукции горизонтальных нитей). Разнонитчатая структура представлена в

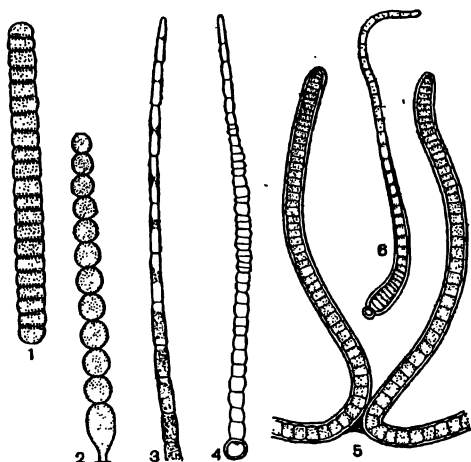


Рис. 5. Нитчатая структура у синезеленых водорослей

1 – простейшее строение нити с диффузным ростом у *Oscillatoria*; 2 – нить с дифференцированным основанием у *Endonema*; 3 – верхушка нити у *Rivularia*, вытянутая в волосок; 4 – интеркалярный рост у *Gloeoetrichia*; 5 – апикальный рост на концах ветвей у *Scytonema*; 6 – базальный рост у *Calothrix*.

отделах синезеленых (порядок *Stigonematales*), зеленых (порядок *Chaetophoraceales*), бурых (порядок *Ectocarpales*) и красных (порядок *Nemaliales*) водорослей. Реже встречается у золотистых и желтозеленых водорослей.

7. Тканевая (паренхимная) структура характеризуется наличием многоклеточных слоевищ в форме пластинок, состоящих из одного, двух или нескольких слоев клеток. Образование их происходит из нити в результате деления

клеток в поперечном и продольном направлениях, в результате чего образуются талломы в виде паренхимных пластинок (часто достигающие нескольких метров). У этих водорослей может наблюдаться функциональная дифференциация слоевища на ассимиляторную, запасующую, механическую, проводящую ткани.

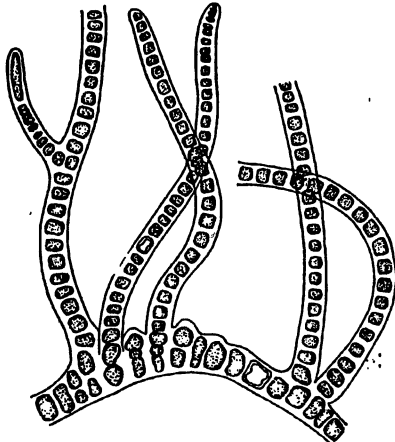


Рис. 6. Разноритчатая структура у синезеленой водоросли *Fischerella*.

Такая структура встречается среди водорослей, свободно растущих распростертыми по субстрату, либо прикрепленных к нему одним концом. Эта структура хорошо представлена в отделах желтозеленых (класс *Heteropodiaceae*), бурых (порядки *Laminariales*, *Fucales*) и красных (порядок *Cryptonemiales*) водорослей. Деление клеток в трех взаимноперпендикулярных плоскостях с образованием объемных многоклеточных паренхимных участков таллома наблюдается также у синезеленых водорослей (порядок *Stigonematales*).

8. Сифональная (неклеточная) структура представляет собой особый тип строения, отличительной чертой которого является отсутствие внутри слоевищ клеточных перегородок при наличии большого количества ядер. Такие слоевища иногда достигают крупных размеров (до нескольких десятков сантиметров). Внешнее расчленение может быть сложным и разнообразным. Талломы сифональной (от греч. «сифон» – трубка) структуры имеют значительную внешнюю расчлененность, формально представляя собой одну клетку с большим количеством ядер.

Пресноводные водоросли сифональной структуры имеют вид слабоветвящихся нитей или шаровидных телец, снабженных ризоподиями (отдел Xanthophyta, порядок Botrydiales). Сифональные представители морских водорослей отличаются большим разнообразием внешнего облика и, подчас, сложным расчленением слоевищ, принимающих у некоторых видов подобие стеблей, листьев и корней.

10. **Харофитная** структура свойственна только харовым водорослям. Наиболее обычны роды хара (*Chara*) и нителла (*Nitella*). Харофитная структура характеризуется крупным многоклеточным слоевищем линейно-членистого строения. Он состоит из главного «побега» с сидящими на нем мутовками членистых «боковых побегов», у некоторых форм ветвящихся. Снизу отходят ризоиды. Места расположения мутовок на главном «побеге» называют узлами, а участки между узлами – междоузлиями. Междоузлия и членики боковых побегов образованы только одной сильно вытянутой клеткой. У многих видов рода хара эти клетки снаружи обрастают еще одним слоем линейно расположенных дополнительных клеток, слагающих так называемую «кору».

РАЗМНОЖЕНИЕ ВОДОРосЛЕЙ

В живой природе известны два основных способа размножения - половое и бесполое. Вегетативный способ размножения является одной из форм бесполого размножения и осуществляется вегетативными частями растений. Эти два способа размножения неодинаково распространены в различных группах животных и растительных организмов. Половое размножение встречается как у одноклеточных (бактерии, водоросли, простейшие), так и у многоклеточных животных и растений. Бесполое размножение широко распространено среди растений, тогда как в животном мире оно встречается весьма ограниченно.

Вегетативное размножение одноклеточных водорослей происходит путем деления клеток надвое, колониальных и многоклеточных - несколькими способами:

- распадом колоний, случайным разрывом нитей или распадом их на небольшие участки при отмирании отдельных клеток;

- акинетами (от греч. «а» - отрицание, «кинетикос» - приводящий в движение) (у зеленых нитчаток, синезеленых и др.);

- механическим разрушением слоевища на части (под действием волн, льда и др.);

- специальными органами вегетативного размножения (одноклеточные или многоклеточные клубеньки у харовых; у некоторых бурых водорослей на слоевищах образуются так называемые почки, которые, опадая, прорастают в новые растения);

- стелющимися побегами, на которых вырастают новые растения (у некоторых красных, бурых, зеленых и харовых водорослей).

У некоторых разноразветвленных водорослей на стелющейся части таллома могут образовываться новые слоевища, которые впоследствии отчлениваются от материнского растения. У ряда нитчатых водорослей (*Ulothrix*, *Cladophora* и др.) отдельные вегетативные клетки округляются, накапливают запасные питательные вещества, а их оболочки утолщаются. Эти покоящиеся клетки (акинеты) способны переживать неблагоприятные условия и давать начало новым растениям (при высыхании водоема, промерзании и др.). Подобные образования, имеющиеся у синезеленых водорослей, называются спорами.

У нитчатых синезеленых водорослей в результате отмирания части клеток или нарушения существующих между ними тесных связей образуются фрагменты, называемые гормогониями (например, у *Lyngbya* sp.). Гормогонии, покрытые толстой оболочкой, которые одновременно выполняют функцию размножения и переносят неблагоприятные условия, носят название гормоцист.

Размножение растений при механическом разрушении слоевищ на части не всегда приводит к развитию нормальных растений. Морские растения, оторванные от твердого субстрата (скал, камней), не способны закрепиться на них, так как органы прикрепления вновь не образуются. Такие слоевища течениями сносятся в спокойные места, где они и продолжают расти лежа на грунте. У этих водорослей никогда не образуются органы полового и бесполого размножения. Размножение их происходит вегетативным способом; старые части растений со временем отмирают, а отходящие от них молодые ветви превращаются в самостоятельные растения. Иногда такие сообщества растений образуют крупные скопления, например,

неприкрепленные формы красных водорослей: филофора (*Phyllophora* sp.) в Черном море, фуцеллария (*Furcellaria* sp.) в Балтийском море, анфельция (*Ahnpheltia* sp.) в дальневосточных морях, бурые саргассумы в Саргассовом море.

Бесполое размножение широко распространено у водорослей и сопровождается, в отличие от вегетативного, делением протопласта клетки на части с последующим выходом продуктов деления из оболочки материнской клетки. Последнее является существенным отличием настоящего бесполого размножения от вегетативного.

Бесполое размножение осуществляется посредством спор или зооспор (спор со жгутиками). Они образуются или в клетках, не отличающихся по форме от других клеток, или в особых клетках, называемых спорангиями, которые нередко сильно отличаются от вегетативных клеток. Отличие спорангиев от других клеток заключается в том, что они возникают как выросты обычных клеток и выполняют только функцию образования спор и зооспор. Количество спор, образующихся в спорангии, колеблется от одной (у *Oedogonium*, *Vaucheria*) до нескольких сотен (у *Cladophora*).

Синезеленые водоросли имеют два типа спор: эндоспоры, образующиеся внутри спорангия в результате дробления его содержимого, и экзоспоры, возникающие как вырост протопласта на вершине клетки. У эукариотических водорослей споры бывают двух основных типов: подвижные, монадной структуры – зооспоры - и неподвижные – акинеты.

Количество зооспор, образовавшихся в одной клетке разных видов водорослей, варьирует от 1, 2, 4, 8 до нескольких сотен. Зооспоры и споры по размеру значительно мельче, чем вегетативные клетки, и имеют более упрощенную форму. Они бывают шаровидными, яйцевидными, эллипсоидными, покрытыми клеточной оболочкой или без нее. Зооспоры бывают с одним, двумя, четырьмя или множеством жгутиков. Поплавав некоторое время, они одеваются оболочкой и прорастают в новую водоросль.

У колониальных монадных и коккоидных зеленых водорослей при бесполом размножении внутри материнской клетки образуются дочерние колонии, которые, прорвав оболочку, выходят наружу и образуют новые растения.

У ряда водорослей споры бесполого размножения неподвижны и носят название **апланоспоры** (от греч. «апланос» - неблуждающий, неподвижный). Они одеваются оболочкой внутри материнской клетки. Если оболочка сильно утолщена, то такие клетки называют **гипноспорами** (от греч. «гипнос» - сон), так как они способны длительное время находиться в состоянии покоя.

Иногда апланоспоры сразу же в материнской клетке приобретают форму подобную ей. В таких случаях говорят об **автоспорах**.

Половое размножение у водорослей тесно связано с половым процессом, который заключается в слиянии двух клеток противоположного пола, в результате чего образуется зигота. Половой процесс широко распространен почти во всех отделах водорослей. Пока он неизвестен лишь у синезеленых.

В простейшем виде половой процесс осуществляется путем слияния содержимого двух жгутиковых подвижных, лишенных оболочек вегетативных клеток; этот тип полового процесса наблюдается у некоторых зеленых (*Dunaliella*), золотистых (*Dinobryon*) и других водорослей. Его называют **хологамия** (от греч. «холос» - цельный), «гамос» – брак). Половой процесс в форме слияния целых (или половинок) протопластов двух безжгутиковых вегетативных клеток, обладающих клеточными оболочками, называют **конъюгацией** (от лат. «кон» - с, «югум» - ярмо; соединение как в упряжке ярмом). Конъюгация - единственная форма полового процесса в классе конъюгат (*Conjugatorhysae*).

У большинства водорослей половой процесс осуществляется слиянием специализированных половых клеток - **гамет** (от греч. «гаметос» - супруг). Они образуются в результате дробления содержимого вегетативных клеток (у наиболее примитивных водорослей) или клеток, выполняющих функцию половых органов, - **гаметангиях**. Число образующихся гамет может колебаться от одной до нескольких сотен. У большинства водорослей мужские гаметы имеют жгутики, у гамет противоположного пола жгутики могут отсутствовать.

В зависимости от относительных размеров и строения гамет, участвующих в слиянии, различают несколько типов полового процесса:

1. **Изогамия** (от греч. «изос» - равный) – обе гаметы подвижны, одинаковой величины и строения;

2. **Гетерогамия** (от греч. «гетерос» – другой, иной) или **анизогамия** (от греч. «ан» – отрицательная частица «не») – женская гамета крупнее мужской, но сходна с ней по строению, обе подвижны;

3. **Оогамия** (от греч. «оон» – яйцо) – мужская маленькая подвижная гамета (сперматозоид или антерозоид) оплодотворяет неподвижную более крупную лишненную жгутиков женскую гамету (яйцеклетка). Оогамия встречается у простых – монадных и коккоидных водорослей, однако гораздо шире распространена у водорослей с нитчатой и тканевой организацией таллома.

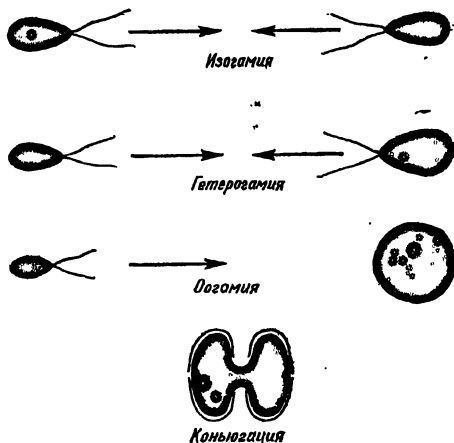


Рис.7. Формы полового процесса у водорослей

6. **Автогамия** (т.е., сам себя оплодотворяю) распространена лишь у диатомовых водорослей и заключается в том, что ядро клетки делится на четыре ядра, два из которых разрушаются, а оставшиеся два ядра сливаются, образуя вновь диплоидное ядро. Автогамия не сопровождается увеличением числа особей, а лишь их омоложением.

Растения, образующие гаметы, могут быть обоеполыми – гомоталличными (от греч. «гоймос» – одинаковый, равный) – и раздельнополыми – гетероталличными. В случае гетероталлизма копуляция происходит между гаметами из разных растений. У некоторых водорослей зигота какое-то время сохраняет жгутики и способность к

активному движению (ее называют планозигота). Затем она теряет жгутики, округляется и покрывается оболочкой.

Оплодотворенная клетка – **зигота** (от греч. «зиготос» - соединенные вместе) покрывается оболочкой (нередко очень толстой) и дает начало новому организму. Зигота содержит одно диплоидное ядро (от греч. «диплос» – двойной) с двойным набором хромосом - продукт слияния ядер двух гамет. Гаметангии, несущие яйцеклетку, называются оогониями, несущие антерозоиды – антеридиями. Среди водорослей с гетеро- и оогамным половым процессом различают обоеполые (или однодомные) виды, у которых мужские и женские гаметы развиваются на одной особи, и раздельнополые (или двудомные) – мужские и женские гаметы развиваются на разных растениях. У морских водорослей прорастание происходит сразу же, а у пресноводных - после состояния покоя. В этом случае образуется гипнозигота.

Половой процесс у водорослей не всегда сопровождается размножением (например, автогамия - у одноклеточных водорослей, конъюгация - у одноклеточных десмидиевых).

У одного и того же вида водорослей в зависимости от времени года и условий среды могут наблюдаться разные формы размножения (бесполое и половое). При этом происходит смена ядерных фаз - **гаплоидной** (от греч. «гаплос» - один) и **диплоидной**.

Поскольку при половом процессе в результате слияния гамет и их ядер набор хромосом в ядре удваивается, в какой-то момент цикла развития наступает редукционное деление ядра (мейоз), в результате которого дочерние ядра получают одинарный набор хромосом. В зависимости от места мейоза в цикле развития различают **зиготическую** (мейоз происходит в зиготе при ее прорастании), **гаметическую** (место мейоза – в гаметангиях, при образовании гамет), **спорическую** (мейоз – в спорангиях при образовании спор) и **соматическую** (мейоз - в вегетативных клетках) редукции.

Развитие органов размножения того или иного типа у гаметоспорофитов в основном определяется температурой среды, а в некоторых случаях и другими факторами (интенсивностью света, длиной светового дня, сезонными изменениями химического состава вод, соленостью и др.).

В первом случае наблюдается закономерная смена двух различающихся по плоидности форм развития: диплоидного спорофита, образующего только споры, и гаплоидного гаметофита, производящего гаметы (Ulva). Во втором случае весь цикл развития водорослей проходит в гаплоидной фазе, только зиготы диплоидны (вольвоксовые, хлорококкальные, хроофициевые, конъюгатофициевые и др.), в третьем – цикле развития преобладает диплоидная фаза, только гаметы гаплоидны (диатомовые). При соматической редукции вегетативные клетки из различных участков одной и той же особи могут отличаться по плоидности их ядер (четвертый случай).

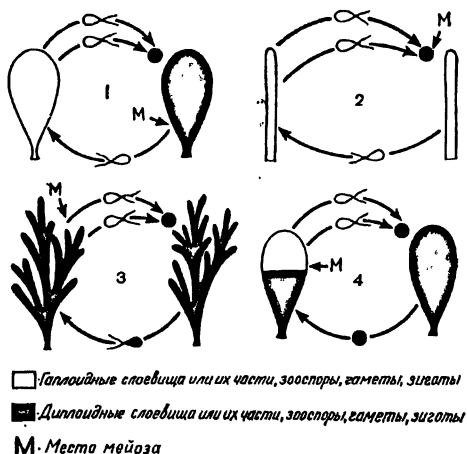


Рис. 8. Смена ядерных фаз у водорослей

1 – спорическая редукция (диплогаметофазный жизненный цикл); 2 – зиготическая редукция (лишние ядра редуцируются; гаплогаметофазный жизненный цикл); 3 – гаметическая редукция (диплогаметофазный жизненный цикл); 4 – соматическая редукция (диплогаметофазный жизненный цикл).

Гаметофиты и спорофиты бывают одинакового или разного строения (изоморфная и гетероморфная смена форм развития). У подавляющего большинства водорослей гаметофиты и спорофиты – самостоятельные растения, в других случаях - одна из форм развития может паразитировать или развиваться в качестве эпифита на другой.

Смена форм развития растений называется **чередованием поколений**.

Циклы развития у водорослей отличаются большой пластичностью. Их прохождение во многом определяется экологическими условиями. Поэтому они далеко не всегда сопровождаются строго последовательным проявлением всех стадий. В зависимости от условий произрастания отдельные стадии и формы развития могут выпадать полностью или, наоборот, существовать на протяжении нескольких поколений, с тем, чтобы в течение периода жизни одного поколения уступить место другой форме развития.

Некоторые водоросли в неблагоприятных условиях сохраняются и воспроизводятся благодаря образованию цист (золотистые, желтозеленые, диатомовые, эвгленовые и динофитовые). Каждая клетка формирует одну цисту. При этом содержимое клетки плазмолизируется, округляется и вырабатывает новую твердую оболочку, часто содержащую кремнезем. При прорастании цисты обычно образуется одна особь, реже – несколько.

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ГРУППИРОВКИ ВОДРОСЛЕЙ

ПЛАНКТОННЫЕ ВОДРОСЛИ

К планктонным организмам (от греч. «планктос» – парящий, блуждающий) относятся виды, обитающие в толще воды во взвешенном состоянии. Термин «планктон» в 1886 г. впервые был использован немецким ученым В.Гензенем.

Под фитопланктоном обычно понимают совокупность свободноплавающих в толще воды мелких, преимущественно микроскопических водорослей. Пелагический образ жизни ведут большинство видов диатомовых, динофитовых, зеленых, золотистых, синезеленых. Бурые, красные и харовые водоросли ведут бентосный образ жизни, однако некоторые виды саргассума (из бурых водорослей) приспособились к жизни в толще воды Саргасового моря.

Приспособления организмов к планктонному образу жизни сводятся, прежде всего, к обеспечению плавучести, поскольку их удельная масса обычно несколько больше единицы.

Скорость погружения организма зависит от остаточной массы (разница между массами организма и вытесненной им воды), вязкости воды и сопротивления формы, поэтому организмы увеличивают плавучесть за счет повышения трения о воду и уменьшения остаточной массы.

Снижение остаточной массы обеспечивается, прежде всего, за счет максимального приближения удельной массы водорослей к удельной массе воды. Некоторые водоросли, такие, например, как синезеленые и зеленые, образуют вокруг клетки богатые водой мощные слизистые оболочки. По своим размерам эта слизь нередко превосходит сам организм.

Один из самых обычных способов снижения удельной массы водорослей - это накопление жира. Жир вместо тяжелого крахмала отлагается в качестве запасного питательного вещества у планктонных диатомовых и динофитовых водорослей. Эффективное средство повышения плавучести – газовые включения в цитоплазме или в специальных воздушных полостях. Многие виды синезеленых имеют газовые вакуоли, уменьшающие их удельную массу.

Повышение трения о воду обеспечивается за счет увеличения удельной поверхности тела. С уменьшением размера организмов удельная поверхность возрастает, что позволяет им осуществлять длительное парение в толще воды. Отсюда наиболее характерная черта планктона – микроскопические размеры. Помимо этого, увеличение удельной поверхности организмов достигается за счет уплощения, расчленения тела, образования различного рода выростов и придатков – шипов, щетинок, роговидных отростков и т.д. Тело водорослей порой принимает ажурную форму. С повышением температуры воды условия плавучести ухудшаются, в связи с этим у водорослей увеличиваются размеры отростков и их количество.

Фитопланктон обитает в разнообразных водоемах - от морей и океанов до небольшой пересыхающей лужи. В морях, крупных озерах и медленно текущих реках в толще воды в основном представлены планктонные водоросли, тогда как в мелких водоемах и реках с быстрым течением к планктонным организмам примешиваются и донные обитатели. Однако отдельные группы водорослей из ряда отделов (к примеру, синезеленых, диатомовых, зеленых) в больших количествах встречаются в биоценозе бентоса и обрастаний (Девяткин, 2003).

На распространение фитопланктона в толще воды оказывает влияние ее прозрачность, наличие биогенных элементов, температура и другие факторы. Глубина, на которой обнаруживаются планктонные водоросли, зависит от типа водоема, прозрачности и меняется, как правило, от нескольких метров в пресных водоемах, до 100 м и более в морях и океанах. Основная масса планктона концентрируется в верхней, хорошо освещенной толще воды.

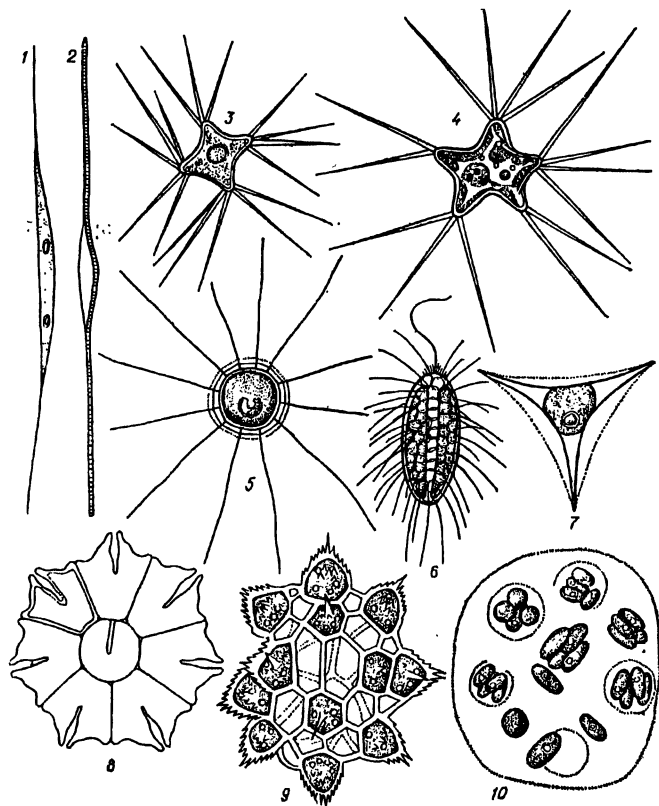


Рис. 9. Планктонные водоросли

1 – *Schroederia setigera*, 2 – *Nitzschia longissima*, 3 – *Polyedriopsis spinulosa*, 4 – *Pseudopolyedriopsis skujae*, 5 – *Golenkinia radiata*, 6 – *Mallomonas elegans*, 7 – *Treubaria triappendiculata*, 8 – *Pediastrum tetras*, 9 – *Ducellieria chodatii*, 10 – *Coenocystis subcylindrica*.

В прозрачных водоемах большая часть водорослей концентрируется не в самых поверхностных слоях воды, а несколько глубже. Это связано с тем, что во время интенсивного развития водорослей биогенные вещества (азот, фосфор) и микроэлементы (медь, цинк, марганец, кобальт и др.) в верхних слоях потребляются, а в более глубоких слоях имеется постоянный приток этих соединений из придонных слоев.

Общее число видов фитопланктона в морях и внутренних водоемах достигает 3000 видов.

Морской и океанический планктон представлен в основном диатомовыми и динофитовыми водорослями. Первые доминируют в арктических водах, а динофитовые – тропиках. Зеленые и синезеленые представлены меньшим числом видов.

В пресноводном планктоне большим разнообразием отличаются зеленые, синезеленые, диатомовые, динофитовые и эвгленовые водоросли (Девяткин, 2003). Из зеленых особенно обильны одноклеточные и колониальные вольвоксовые и хлорококковые: виды родов хламидомонас (*Chlamydomonas*), гониум (*Gonium*), вольвокс (*Volvox*), эвдорина (*Eudorina*), пандорина (*Pandorina*), педиаструм (*Pediastrum*), сценедесмус (*Scenedesmus*), ооцистис (*Oocystis*), сфероцистис (*Sphaerocystis*) и др.

Из синезеленых наиболее многочисленны виды родов анабена (*Anabaena*), микроцистис (*Microcystis*), афанизоменон (*Aphanizomenon*), осциллятория (*Oscillatoria*), глеотрихия (*Gloeotrichia*) и др.

В пресноводном планктоне из перидиниевых наиболее обычны виды рода цератиум (*Ceratium*) и перидиниум (*Peridinium*). Из жгутиковых в большом количестве представлены хризомонады – виды родов динобрион (*Dinobryon*), малломонас (*Mallomonas*), уроглена (*Uroglena*) и др., а также эвгленовые - эвглена (*Euglena*), трахеломонас (*Trachelomonas*).

Видовое разнообразие диатомовых в пресных водоемах значительно меньше, чем в морях; преобладают виды родов мелозира (*Melosira*), астерионелла (*Asterionella*), табеллярия (*Tabellaria*), фрагиллярия (*Fragilaria*), циклотелла (*Cyclotella*) и др. В крупных глубоких озерах, таких как Байкал, Ладожское, Онежское,

диатомовые преобладают в планктоне почти круглогодично. Видовой состав их отличен от морского, но в их экологии немало общего. Например, мелозира исландская (*Melosira islandica*) – массовый вид фитопланктона Ладожского и Онежского озер, а также мелозира байкальская (*Melosira baicalensis*) из Байкала в фазе покоя после весенней вспышки не опускаются на дно, как это наблюдается у других пресноводных видов в водоемах меньшего размера, а находятся в толще воды, образуя на некоторой глубине характерные межсезонные скопления.

В озерах среднего размера умеренной зоны, в зависимости от типа водоема и времени года, в фитопланктоне преобладают диатомовые, синезеленые и зеленые водоросли (в основном описанные выше виды).

В водоемах с мягкой водой, находящихся под влиянием болот, многочисленны десмидиевые: виды рода космариум (*Cosmarium*), кластериум (*Closterium*), эуаструм (*Euastrum*), стаураструм (*Staurastrum*) и др.

В фитопланктоне озер тундры и северной тайги весьма разнообразны холодолюбивые хризомонады: виды родов динобрион (*Dinobryon*), синура (*Synura*), урогленопсис (*Uroglenopsis*), уроглена (*Uroglena*), малломонас (*Mallomonas*).

В малых водоемах – в мелководных озерах и прудах – разнообразны и многочисленны эвгленовые, особенно виды родов трахеломонас (*Trachelomonas*), эвглена (*Euglena*), лепоцинклиз (*Lepocinclis*) и факус (*Phacus*) и зеленые (*Volvox*, *Chlamydomonas*, *Pandorina*, *Eudorina* и др.).

Во временных водоемах – лужах – обычны мелкие вольвоксовые из рода хламидомонас (*Chlamydomonas*), массовое развитие которых окрашивает воду в зеленый цвет.

На распределение и состав фитопланктона в водоемах влияет большой комплекс факторов – световой режим, температура воды, соленость, содержание биогенных элементов (азот, фосфор), а для некоторых видов – кремний, железо и др. Нижняя граница распространения фитопланктона связана с глубиной проникновения света, и колеблется от 2-3 м (пруды, мелкие озера) до 100-120 м (тропические воды океана и некоторых морей). В высокогорных озерах и Байкале фитопланктон встречается на глубинах до 20-40 м.

При общей зависимости фитопланктона от освещенности, оптимальные световые условия у отдельных видов водорослей варьируют в широких пределах. Наиболее требовательны к освещенности – это зеленые и синезеленые водоросли, тогда как диатомовые относятся к тенелюбивым видам.

Температура воды является важным фактором развития водорослей; она определяет географическое их распространение и сезонную динамику. Температурный оптимум у разных видов сильно различается, чем и определяется смена видового состава в течение вегетационного сезона.

Зимой подо льдом фитопланктон развит крайне слабо; основная причина – отсутствие солнечного света и низкая температура. Развитие водорослей начинается в марте-апреле, когда солнечной радиации бывает достаточно для их фотосинтеза подо льдом. В это время основная масса фитопланктона (мелкие жгутиковые рода криptomonас) концентрируются в самом верхнем слое воды.

После освобождения водоема ото льда происходит увеличение численности холодноводных диатомовых (до температуры воды 12°C); им на смену приходят умеренно теплолюбивые диатомовые (до 15°C). Затем в вегетацию вступают зеленые, динофитовые и синезеленые. Последние в мезотрофных и эвтрофных водоемах очень часто вызывают «цветение» воды.

Осенью при понижении температуры воды опять происходит развитие диатомовых вместе с золотистыми и холодолюбивыми синезелеными.

Из химических факторов, влияющих на распределение фитопланктона, на первое место следует поставить солевой состав воды. Концентрация солей определяет тип водоема и, в конечном счете, влияет на видовой состав фитопланктона. Продуктивность водорослей в большой степени зависит от концентрации в воде биогенных элементов, и в первую очередь, от соединений азота и фосфора.

Небольшая часть водорослей обитает у самой поверхности пленки. Это сообщество получило название **нейстон** (от греч. «нейн» - плавать). Жизнь нейстонных организмов связана с поверхностной пленкой воды, причем одни из них находятся над пленкой (**эпинейстон**), другие – под пленкой (**гипонейстон**).

Большие концентрации нейстонных водорослей вначале были обнаружены в мелких водоемах – в прудах, а затем уже и в заливах крупных озер (особенно в тихую погоду при спокойной поверхности воды).

В состав пресноводных водорослей нейстона входят роды разных систематических групп: золотистые - хромелина (*Chromulina*), кремастохризис (*Kremastochrysis*), эвгленовые – эвглена (*Euglena*), трахеломонас (*Trachelomonas*), зеленые - хламидомонас (*Chlamydomonas*), кремастохлорис (*Kremastochloris*) и мелкие протококковые, отдельные виды желтозеленых и диатомовых водорослей.

БЕНТОСНЫЕ ВОДОРОСЛИ (ПЕРИФИТОН, ОБРАСТАНИЯ)

К фитобентосу (от греч. «бенталь»- дно) или донным водорослям относят организмы, жизнь которых тесно связана с дном. Они приспособлены к существованию в прикрепленном состоянии на дне водоемов или разнообразных предметах, находящихся в воде. Понятие «перифитон» включает сообщества организмов, обитающие на разнообразных предметах, в том числе и искусственно внесенных в среду человеком (сваи, суда, причалы и т.д.) и не связанные непосредственно с дном водоема (т.е., возвышающиеся над поверхностью дна). Эти понятия не являются общепринятыми, поэтому мы объединили их в одну экологическую группу.

В зависимости от места произрастания среди бентосных водорослей различают:

1. **Эпилиты** (от «эпи»- сверху, «литос»- камень), растущие на поверхности скал, камней и т.д.
2. **Эпипелиты** (от «эпи»- сверху, «пелос»- ил), населяющие поверхность рыхлых грунтов.
3. **Эпифиты** (от «эпи» – сверху, «фитон» – растение), живущие на поверхности других растений.
4. **Перифитон** (от «пери» – вокруг, около, «фитон» – растение), поселяющиеся на разнообразных предметах, в том числе и на искусственно введенных в воду.

Бентосные водоросли представлены микро- и макроскопическими растениями. Микроскопические водоросли образуют невидимые вооруженным глазом обрастания в виде слизистых пленок, войлочных подушек, тинистых налетов, окрашенных в различные оттенки зеленого, желтого и бурого цвета. Макроскопические талломы образуют густые заросли, напоминающие подводные луга.

Для развития бентосных водорослей, прежде всего, необходим свет, поэтому максимальная глубина распространения водорослей связана с глубиной проникновения солнечной радиации. В пресных водоемах максимальная глубина обитания водорослей не превышает нескольких метров, и только в озерах с прозрачной водой они растут на глубине около 20 м. В морях бентосные водоросли опускаются на глубину до 100 м (у берегов Флориды) и даже до 180 м (в Средиземном море).

На рост и распространение бентосных водорослей оказывают влияние не только свет, но и движение воды, температура, биогенные элементы, животные, субстрат, на котором обитают водоросли, и многие другие.

Как правило, места с интенсивным движением воды отличаются пышным развитием бентосных водорослей. В морях - районы мысов и другие прибрежные участки, где наблюдается постоянный прибой. В пресных водах - это камни на перекатах рек и ручьев, где вода течет с большой скоростью.

Движение воды способствует обогащению среды биогенными веществами, за счет постоянного их притока. Бентосные водоросли, растущие в условиях движения воды, получают преимущества по сравнению с растениями, произрастающими в тихих местах. С другой стороны, сильные течения и волнения отрицательно сказываются на растениях: происходит их повреждение и отрыв от грунта.

В пресных водоемах преобладающее значение на дне имеют разнообразные диатомовые, зеленые, синезеленые и желтозеленые нитчатые водоросли, прикрепленные или неприкрепленные к субстрату. Среди них наиболее часто встречаются виды родов *Navicula*, *Nitzschia*, *Diatoma*, *Rhoicosphenia*, *Gyrosigma*, *Cladophora*, *Oedogonium*, *Ulothrix*, *Stigeoclonium*, *Spirogyra*, *Mougeotia*, *Zygnema*, *Oscillatoria*, *Lyngbya*, *Phormidium*, *Microcoleus*, *Tribonema*, *Vaucheria* и др. Красные

водоросли представлены лишь небольшим числом видов, из них наиболее часто встречаются виды рода батрахоспермум (*Batrachospermum* sp.).

Прикрепленные водоросли, как правило, обитают на твердом субстрате; на рыхлом грунте (песке, иле) развиваются преимущественно неприкрепленные диатомовые, золотистые, эвгленовые, криптофитовые, динофитовые. Харовые водоросли с их длинными ризоидами хорошо растут на илистом дне.

Особенно пышное развитие бентосных водорослей наблюдается в водоемах с твердым дном и интенсивным движением воды, которое улучшает минеральное питание и препятствует заилению субстрата. В реках, горных ручьях и потоках формируются своеобразные сообщества реофильных водорослей, предпочитающих места с постоянным течением (пресноводные красные – *Lemanea*, *Chaetmansia*, *Hildenbrandtia*, *Thorea* и золотистая *Hydrurus*).

В небольших водоемах (канавах, прудах) и в прибрежной части крупных озер много прикрепленных водорослей. Это многообразные нитчатки из зеленых (*Spirogyra*, *Oedogonium*), разножутиковых (*Tribonema*) и синезеленых (*Oscillatoria*, *Lyngbya*, *Tolypothrix*), а также диатомей. Самые крупные представители пресноводного фитобентоса – харовые водоросли. Виды рода хара (*Chara*) и нителла (*Nitella*) наиболее часты в прудах и озерах с илистым дном, где они образуют густые заросли, прочно закрепленные в субстрате с помощью длинных ризоидов. Большой таллом - до 1,5 м в длину - имеет во взрослом состоянии водяная сеточка (*Hydrodictyon reticulatum*). Эта зеленая водоросль растет в прудах и ручьях, богатых соединениями азота. Из бентосных синезеленых преобладает носток (*Nostoc punctiforme*), колонии которого достигают размера крупного яйца.

Среди зарослей высших растений и нитчаток поселяются неприкрепленные одноклеточные водоросли с крупными клетками (виды *Nannomonas*, *Chlorococcum*, *Macrochloris*, *Oocystis*, *Closterium*, *Cosmarium*), колониальные слизистые (*Heleochloris*, *Dispora*, *Tetraspora*) или ценобиальные водоросли (виды *Pediastrum*, *Scenedesmus*, *Sorastrum* и др.). Некоторые из них являются факультативно планктонными и факультативно бентосными, развивающимися в различные периоды жизненного цикла в разных биотопах. Лишь некоторые представители подобных ценозов имеют специальные приспособления в виде слизистых тяжей или длинных

щетинок, приподнимающих клетки водорослей над поверхностью ила (виды *Eremosphaera*, *Asterococcus*, *Golenkiniopsis* и др.).

Выделение перифитона в качестве особой группировки обосновывается особенностями температурного, светового и химического режимов среды, в которой находятся организмы, обитающие на различных предметах.

В перифитоне развиваются водоросли из разных систематических групп (преимущественно зеленые, синезеленые, диатомовые и желтозеленые), обычно обладающие специальными органами (органоидами) прикрепления в виде подошвы, стопы, слизистых тяжей (виды родов *Ulothrix*, *Oedogonium*, *Aphanochaete*, *Hydrurus*, *Phaeothamnion*, *Characium*, *Gomphonema* и др.). Обильны также синезеленые, прикрепляющиеся к подводным предметам с помощью слизи (виды родов *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Calothrix*, *Rivularia*, *Gloeotrichia*, *Nostoc*), диатомовые, плотно прилегающие к субстрату непосредственно нижней створкой со швом (виды родов *Achnanthes*, *Cocconeis* и др.).

Многие виды (например, принадлежащие к родам *Apiocystis*, *Tetraspora*, *Characium* и др.) мало требовательны к субстрату; селятся как на растениях, так и на любом другом субстрате. В других случаях наблюдается отчетливая специализация к определенному субстрату. Например, *Haleococcus mucicolus* поселяется в слизи *Coleochaete pulvinata*, *Chlorangiochaeta epiphytica* – на *Chaetophora tuberculata*, виды рода *Porochloris* – на *Sphagnum* и т.д. Наиболее благоприятным субстратом для поселения эпифитов являются нити *Oedogonium*, *Cladophora*, *Vaucheria*, в меньшей степени – *Microspora*, *Tribonema*.

ИЗМЕНЕНИЕ ВИДОВОГО СОСТАВА ФИТОПЛАНКТОНА ПРИ ЭВТРОФИРОВАНИИ ВОДОЕМОВ

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ СРЕДЫ НА РАЗВИТИЕ ВОДОРосЛЕЙ

Одним из показателей функционирования сообщества фитопланктона и степень его приспособленности к среде обитания, является сезонная сукцессия. Исследователи отмечают постоянство сезонной сукцессии фитопланктона в каждом отдельно взятом водоеме. Определенная последовательность доминирования тех или

иных видов водорослей повторяется из года в год. Отмечающиеся различия по годам в основном носят количественный характер и обусловлены разным уровнем численности их популяций (Михеева, 1983). Однако в водоемах, подвергшихся антропогенному воздействию (прежде всего при эвтрофировании, ацидофикации, поступлении различных загрязнителей), происходит нарушение хода естественной сезонной сукцессии фитопланктонного сообщества. Наряду с изменениями биомассы и смены доминирующих видов на новые, наиболее приспособленные к изменившимся условиям среды, происходит нарушение естественного хода сезонной сукцессии.

Прежде всего необходимо дать определение сукцессии. Под сукцессией (от лат. "сукцессия" – преемственность, последовательность) понимается последовательность смены сообществ, сменяющих друг друга в данном биотопе в течение достаточно длительного времени (Одум, 1975). Сукцессии происходят как в результате изменения условий произрастания растений под воздействием жизнедеятельности организмов, входящих в состав биоценозов, так и под воздействием внешних факторов среды.

Сезонная сукцессия фитопланктона определяется целым комплексом взаимосвязанных факторов, среди которых ведущая роль принадлежит световым условиям, температуре воды, динамике водных масс, концентрации биогенных элементов, а также биологическим факторам (таким как выедание водорослей животными, конкуренция между самими водорослями, паразитизм, отмирание и др.).

Первостепенная роль в развитии водорослей отводится **световому фактору**, которая проявляется в сезонном, суточном развитии и вертикальном распределении фитопланктона.

Одни водоросли, к примеру, диатомовые, менее требовательны к световым условиям, поэтому они первыми начинают вегетацию. Большинство из них избегают в летнее время ярко освещенного поверхностного слоя воды и развиваются на глубине 2-3 м (в водоемах с низкой прозрачностью) и на глубине 15-20 м в прозрачных водах морей.

Зеленые и синезеленые водоросли более требовательны к свету и в основной массе развиваются в середине летнего сезона. Осенью, когда количество света уменьшается, снова появляются диатомовые.

Экспериментальными работами показано, что прирост биомассы водорослей идет пропорционально количеству поглощенного света, затем наступает световое насыщение, а дальнейшее увеличение радиации тормозит их развитие (Финенко, 1976). Чрезмерно сильный свет действует на водоросли губительно.

Водоросли, обладающие активным движением, способны сами выбирать себе оптимальную по свету глубину. Однако и водоросли, не способные к движению, скапливаются ниже зоны оптимальных фотосинтетических условий и остаются там достаточно долго. Так, многолетние исследования на Шекснинском и Рыбинском водохранилищах показали, что только в 27% случаев биомасса фитопланктона в фотическом слое превосходила биомассу на других горизонтах, в 38% - наибольшая биомасса была зарегистрирована ниже компенсационной точки (на глубинах 2-8 м), а в 35% случаев - стратификация в распределении фитопланктона отсутствовала (Кузьмин, Елизарова, 1967; Кузьмин, 1971). То же самое наблюдали и в озере Глубокое (Московская обл.); основная масса фитопланктона концентрировалась непосредственно над слоем температурного скачка (на глубине 4-8 м), хотя фотосинтез в основном протекал на глубине до 2-4 м (Садчиков, 1997).

Водоросли способны переносить большой диапазон колебаний температур и встречаются в планктоне разных географических широт и в разные сезоны года.

Общая схема годового цикла развития фитопланктона в озерах умеренных широт имеет следующий вид (Николаев, 1977): зимой фитопланктон подо льдом развит крайне слабо в связи с недостатком солнечной радиации. Вегетационный сезон фитопланктона начинается в марте-апреле, когда солнечной радиации вполне достаточно для фотосинтеза водорослей даже подо льдом. В это время довольно многочисленны мелкие жгутиковые (*Cryptomonas*, *Chromulina*, *Chrysococcus*). Затем происходит повышение численности холодноводного комплекса диатомовых: *Melosira*, *Diatoma* и др. При температуре 6-8⁰С наблюдается максимальное развитие широко распространенной в озерном планктоне *Melosira islandica*, которая обычно присутствует и при более высоких температурах (до 13⁰С и выше).

Во вторую фазу весны, с момента вскрытия озера и до установления температурной стратификации (при прогреве верхнего слоя воды до 10-12⁰С), наблюдается развитие более теплолюбивого комплекса диатомовых: *Asterionella*, *Fragilaria*, *Tabellaria*, которое продолжается и в первой фазе летнего сезона (до 15⁰С). Одновременно повышается продуктивность зеленых, синезеленых и динофитовых водорослей. В это время в зависимости от типа водоема это могут быть виды родов *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Gloeotrichia*, вызывающие “цветение” воды, динофитовые *Ceratium*, *Peridinium*, а также зеленые водоросли (*Scenedesmus*, *Pediastrum*, *Oocystis* и др.). Разные виды водорослей могут иметь разные границы температурного оптимума.

Диатомовые водоросли летом, как правило, занимают подчиненное положение и представлены теплолюбивыми видами: *Melosira granulata* и видами родов *Fragilaria*, *Cyclotella*, *Synedra* и др. Осенью с понижением температуры воды до 12-10⁰С и ниже наблюдается увеличение продуктивности холодолюбивых видов диатомовых. Однако в отличие от весеннего сезона осенью заметно большую роль играют синезеленые (*Anabaena*, *Woronichinia*), золотистые (*Dinobryon*, *Uroglenopsis*) и др. (Николаев, 1977).

Вертикальное распределение фитопланктона и его продукционные характеристики зависят от прозрачности водоема. Увеличение мутности (преимущественно за счет минеральной взвеси) приводит к снижению развития водорослей; при этом уменьшается не только количество водорослей, но и их видовой состав.

Наиболее чувствительны к помутнению воды – это синезеленые из родов *Anabaena* и *Microcystis*. Вслед за синезелеными при увеличении мутности из состава фитопланктона выпадают диатомовые. Более выносливыми являются хлорококковые (особенно виды рода *Scenedesmus*, *Coelastrum*) и эвгленовые.

Большое значение в развитии фитопланктона придается динамическому режиму вод (перемешиванию вод). Турбулентное перемешивание вод приводит к повышению продуктивности диатомовых водорослей, так как многие виды этого отдела, обладая относительно тяжелой кремниевой оболочкой, в спокойной воде довольно быстро опускаются на дно. Поэтому ряд видов диатомовых развивается

лишь весной и осенью в периоды активного вертикального перемешивания вод (Киселев, 1980). Скорость оседания водорослей в спокойной воде колеблется у разных видов от 0,41 до 29 см/ч (Виноградова, 1977).

Другие водоросли, прежде всего синезеленые, не выносят даже слабого турбулентного перемешивания и развиваются в спокойной воде. Из-за этого они практически отсутствуют в реках, а в стратифицированных озерах обычно развиваются в нижней части эпилимниона (Skulberg, 1978).

Положительное влияние динамического фактора на продуктивность планктона состоит в лучшем снабжении клеток водорослей питательными веществами. В мелководных водоемах высокая турбулентность приводит к увеличению мутности, что отрицательно сказывается на развитии фитопланктона.

Биогенные элементы являются одним из наиболее важных факторов, влияющих на развитие фитопланктона. Обеспеченность биогенами сказывается на видовой структуре сообщества, его численности и продолжительности вегетации. Дефицит минеральных элементов – лимитирует развитие фитопланктона, снижает темп размножения водорослей, приводит к замене одних групп водорослей другими.

Потребность в тех или иных биогенных элементах у разных систематических групп водорослей (а также у одного и того же вида) неодинакова и зависит от многих факторов, в том числе и от их физиологического состояния. Различные виды водорослей по-разному относятся к нитратам и аммиачным соединениям, причем оптимальные дозы, обеспечивающие их наилучший рост, сильно различаются (Киселев, 1980).

Реакция водорослей на изменение запасов биогенных элементов в среде зависит от концентрации и формы соединений, биологических особенностей вида, предварительной обеспеченности им клеток, условий освещения и фазы развития (Сиренко, 1978). Источниками многих биогенных соединений, в том числе микроэлементов, служат как минеральные, так и органические соединения.

Необходимо иметь в виду, что при избытке биогенных соединений в среде, многие водоросли способны запасать их в количестве гораздо большем, чем необходимо для нормального роста. Так, *Diatoma elongatum* из оз. Мичиган (США)

запасала фосфаты в 28 раз, а кремний в 4 раза больше, чем требовалось для ее роста (Kilham et al., 1977).

Разные виды фитопланктона совершенно по-разному относятся к наличию в среде тех или иных биогенных соединений и их концентрации. Это является основной причиной сезонной сукцессии фитопланктонного сообщества. Так, диатомовые водоросли развиваются, когда воды богаты нитратами, фосфатами и кремнием (т.е., весной и в начале лета). Причем появление *Asterionella* связано с более высокой концентрацией нитратов и фосфатов, чем нужно, например, для *Tabellaria*. Вегетация *Melosira granulata* хорошо коррелирует с концентрацией в воде органических веществ и развитием синезеленых. Зеленые водоросли появляются летом, когда нитраты и фосфаты находятся в небольшом количестве. Синезеленые способны расти при минимальном количестве нитратов и фосфатов; их рост положительно коррелирует с содержанием в среде органических веществ. Золотистые водоросли обитают в водах с низким содержанием фосфатов (Hegewald et al., 1981).

Представители тех или иных видов водорослей (внутри каждого отдела) по-разному относятся к наличию в среде биогенных элементов. Так, представители класса гормогониевых водорослей (виды рода *Anabaena*) более чувствительны к присутствию биогенов, чем представители класса хроококковых водорослей (например, виды рода *Microcystis*). Снижение темпа роста *Microcystis* при дефиците фосфора в среде происходит менее заметно, чем у *Anabaena*, которая быстрее использует запасы внутриклеточного фосфора. Широкие адаптационные возможности синезеленых, способность активно усваивать биогены в виде органических соединений позволяет им легко приспосабливаться к неблагоприятным условиям, при которых многие виды не могут развиваться.

Изменение концентрации биогенных элементов в среде ведет к замене в фитопланктонном сообществе одних видов водорослей другими: диатомовых - зелеными, а затем и синезелеными.

Кроме того, на развитие водорослей оказывают влияние их физиологические показатели (Киселев, 1980), связанные с тем, что:

- разные виды водорослей нуждаются для своего развития в различном количестве биогенных соединений;
- скорость поглощения биогенов неодинакова у разных видов водорослей;
- высокие концентрации биогенов оказывают отрицательное влияние на одни виды водорослей, тогда как другие – хорошо развиваются;
- водоросли обладают способностью запасать биогенные вещества и микроэлементы;
- водоросли с разной скоростью расходуют запасенные биогенные соединения;
- минимальные концентрации биогенов, при которой происходит прекращение роста, неодинакова для разных видов водорослей;
- имеется различие в способности потреблять биогены при наличии и отсутствии света;
- биогенное голодание по разному влияет на физиологические показатели разных видов водорослей.

На развитие водорослей большое значение оказывает соотношение биогенных элементов в среде, и в первую очередь, отношение азота к фосфору. Так, в ряде американских озер (Jones, Bachmann, 1975) соотношение N: P находится в пределах 13:1 – 39:1, что близко к соотношению этих элементов в клетках водорослей 15:1. В океаническом фитопланктоне соотношение Si : N: P = 20:15:1. В то же время по другим данным отношение азота к фосфору у пресноводного фитопланктона варьирует от 4 до 290. Когда соотношение общего азота к общему фосфору менее 10, развитие фитопланктона чаще всего лимитирует азот, а когда оно более 17, лимитирует фосфор (Винберг, 1981; Левич, Булгаков, Замолотчиков, 1996; Левич, Максимов, Булгаков, 1997).

Для синезеленых, обладающих способностью к азотфиксации, лимитирующим элементом чаще всего является фосфор. При его избытке эти водоросли развиваются в огромных количествах, что приводит к “цветению” водоемов.

По мере увеличения биогенной нагрузки на водоемы наряду с общим увеличением численности и биомассы водорослей фитопланктонного сообщества

происходят изменения и в сезонной сукцессии, устойчивость которой для каждого водоема имеет свои пределы.

ИЗМЕНЕНИЕ ВИДОВОГО СОСТАВА ФИТОПЛАНКТОНА ПРИ ЭВТРОФИРОВАНИИ ВОДОЕМОВ

Главным фактором, определяющим эвтрофирование водоемов, является повышение нагрузки биогенных элементов, прежде всего фосфора, стимулирующего развитие фитопланктона. В пределах изменения концентрации фосфора от 0,01 до 0,15 мг/л средняя за сезон биомасса фитопланктона увеличивается от 0,4 до 20 г/м³, а годовая первичная продукция – от 23 до 326 г С/м³ (Трифенова, 1990).

Прямая зависимость между продуктивностью фитопланктона и содержанием фосфора позволяет прогнозировать процессы эвтрофирования даже на самых ранних стадиях, еще до того, когда произойдут структурные изменения фитопланктонного сообщества. Структура и продуктивность фитопланктона зависит не столько от климатических особенностей региона, сколько от уровня поступления биогенных элементов и условий перемешивания, связанных с морфометрией водоемов и их проточностью.

Обычно выделяют два типа развития видов в фитопланктоне – сезонную, связанную с последовательной сменой популяций в годовом цикле, и сукцессию, обусловленную эволюцией самих водоемов (Трифенова, 1986).

В сезонной динамике развития фитопланктона выделяют четыре основных периода, которые по гидрологическим условиям соответствуют периодам весенней и осенней циркуляции, зимней и летней стагнации водных масс.

Зимний период (в основном с ноября по март) характеризуется наиболее слабым развитием фитопланктона и наименьшими величинами его биомассы.

Весенний период начинается с марта-апреля (началом прогрева водных масс) и продолжается до установления термической стратификации в июне при температуре воды около 10°C. В условиях максимального содержания биогенных элементов наблюдается весенний пик развития фитопланктона, в основном за счет мелких быстрорастущих видов. Фитопланктон, как правило, характеризуется монодоминантностью.

Летний период начинается с установления термической стратификации в мае-июне и длится вплоть до конца лета-начала осени. Причем в этот период может происходить нарушение термической стратификации при ветровом перемешивании. Летом наблюдается несколько пиков развития и отмирания фитопланктона. При отмирании водорослей осуществляется их минерализация и в среде вновь появляются биогенные элементы, исчерпанные в период весеннего развития водорослей. В летний период вначале развиваются мелкие формы водорослей (криптомонады и хризофитовые), затем по мере увеличения в среде биогенов преобладающими становятся крупные диатомеи из родов *Fragilaria*, *Asterionella*, *Melosira*. При их развитии, с одной стороны, происходит истощение азота и кремния, с другой – накапливаются легкоусвояемые органические вещества. Затем появляются синезеленые и *Ceratium*. В целом летний фитопланктон характеризуется наибольшим видовым разнообразием с преобладанием крупных и подвижных медленнорастущих видов. Они способны наиболее эффективно использовать имеющиеся питательные ресурсы, в том числе – за счет потребления органических форм биогенов.

Осенний период начинается после перемешивания вод с началом осенней циркуляции (чаще всего в середине сентября) и продолжается до ледостава. Этот период характеризуется повышением биомассы осенних диатомовых (начиная с конца августа) и одновременным появлением в планктоне холодолюбивых перидиней. В теплые годы наблюдается массовое развитие синезеленых.

В целом данная схема сезонной сукцессии достаточно универсальна, однако в условиях конкретных водоемов наблюдается значительно большее количество вариантов, в зависимости от их морфометрии, погодных условий и содержания биогенных элементов.

В процессе эвтрофирования водоемов наряду с общим повышением биомассы фитопланктона и сменой доминирующих видов происходит изменение и сезонной сукцессии фитопланктона.

Сезонное развитие фитопланктона связано с тем, что массовое развитие какого-либо вида вызывает изменение среды (например, истощение биогенных и иных элементов, изменение рН, поступление в среду тех или иных органических соединений и др.), что является предпосылкой для развития других водорослей

(Fogg, 1965; Reynolds, 1984). Внезапное увеличение численности одного из доминирующих видов или даже субдоминантов (т.е., «вспышка» вида), – свидетельствует о нарушении стабильности экосистемы (Федоров, 1970) и может служить показателем начальной стадии эвтрофирования.

Наибольшую роль в биомассе большинства водоемов играют синезеленые, динофитовые, диатомовые и зеленые водоросли.

При эвтрофировании водоемов развитие диатомовых водорослей идет от бедного диатомового планктона с преобладанием центрических диатомей (*Melosira*, *Cyclotella*, *Stephanodiscus*) к пеннатным диатомеям, способных расти в среде, богатой органическим веществом. Решающим фактором в развитии диатомей является способность отдельных видов адаптироваться к условиям меняющегося соотношения кремния и фосфора в среде (Tilman, 1977; Tilman et al., 1986).

Синезеленые водоросли также широко распространены в планктоне большинства водоемов. Эвтрофирование водоемов приводит к увеличению роли синезеленых и динофитовых водорослей. Большинство видов синезеленых (а также и эвгленовых водорослей) принято считать индикаторами эвтрофирования водоемов.

Массовое развитие синезеленых вызывает “цветение” воды в эвтрофных водоемах. Среди видов “цветения” воды наиболее обычны представители гормогониевых водорослей из родов *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Gloeotrichia*, *Oscillatoria*, *Lyngbya*.

Из представителей хроококковых массового развития достигают виды рода *Microcystis*. Виды из родов *Gloeocapsa*, *Merismopedia*, *Gomphosphaeria*, *Coelosphaerium*, *Synechocystis* в качестве массовых отмечаются значительно реже, в основном в мелководных озерах с повышенной минерализацией (Bailey-Watts, 1978).

В водоемах всех широт синезеленые представлены в основном летними и летне-осенними видами. Их вегетация, как правило, приурочена к периоду наибольшего прогревания воды с присутствием в среде относительно большого количества органических веществ. В водоемах умеренных широт прослеживается определенная последовательность в появлении и вегетации синезеленых водорослей.

Вегетация видов рода *Anabaena* чаще всего начинается первой. *A. lemmermannii* дает вспышку развития в июне-июле в период постепенного

прогрева воды и достаточно устойчивой стратификации. Максимальной численности она достигает в конце июня при температуре воды около 20°C.

Aphanizomenon flos-aquae появляется в планктоне водоемов в конце мая-начале июля; вегетация его продолжается до начала сентября. В некоторых водоемах этот вид может быть одним из доминирующих с максимальной численностью в середине августа.

Gloeotrichia echinulata отличается наиболее коротким периодом вегетации. Она появляется в планктоне в июне и исчезает в конце августа, давая за это время несколько всплесков развития. *Gloeotrichia* способна (в отличие от большинства видов синезеленых) давать в течение сезона несколько коротких всплесков и спадов развития. Максимальной численности этот вид достигает в высокотрофных водоемах.

Виды рода *Microcystis* считаются летне-осенними. Развитие *M.aeruginosa* начинается несколько позже *Anabaena* и *Aphanizomenon* и продолжается до октября. Иногда развитие этого вида имеет место и в ноябре. *M.aeruginosa*, по-видимому, является эвритермным видом, т.к. вегетирует в диапазоне температур от 7 до 25° и даже подо льдом.

Массовое развитие видов рода *Oscillatoria* (прежде всего *O.agardhii* и *O.redekei*) наиболее характерно для эвтрофных водоемов. Эти два вида вегетируют круглогодично, давая несколько всплесков развития. Максимум их численности, как правило, отмечается в конце лета и осенью. *O.agardhii*, как правило, концентрируется в слое термоклина, а иногда – и в верхней части гипolimниона. Этот вид способен регулировать свою плавучесть, кроме того, адаптирован к низкой температуре и освещенности. Виды рода *Oscillatoria* способны к гетеротрофному питанию; могут потреблять биогенные элементы в виде органических соединений. Преобладание их в планктоне, особенно *O.agardhii*, является показателем высокой степени эвтрофирования, причем не только в результате обогащения среды фосфором, но и органическим веществом (Edmondson, 1969; Ahlgren, 1970, 1978).

Синезеленые способны усваивать все формы азота (нитраты, нитриты, аммонийный и свободный азот), причем конкретные виды водорослей могут отдавать предпочтение разным его формам. Наименее требовательны к источникам

азота виды *Anabaena*, способные к азотфиксации. Накопление их биомассы в водоеме происходит независимо от количества и формы азота в среде. *Aphanizomenon* и *Microcystis* способны развиваться при полном отсутствии нитратов, используя для роста аммонийный азот (Сиренко, 1972). Виды рода *Oscillatoria* могут расти на органической среде, потребляя аминокислоты (Skulberg, 1972).

С этим, по-видимому, связана и сама сукцессия синезеленых водорослей при эвтрофировании водоемов. Как правило, в олиготрофных водоемах появляются виды рода *Anabaena*, в мезотрофных - в массе развиваются виды родов *Anabaena*, *Aphanizomenon* и *Microcystis*. В эвтрофных водоемах появляются виды из родов *Oscillatoria* и *Lyngbya*; они же доминируют и в высокотрофных водоемах. Кроме того, синезеленые способны регулировать плавучесть, что позволяет им выбирать оптимальные для жизни горизонты толщи воды (Сиренко, 1972; Сиренко, Кокырца, 1981).

Из динофитовых водорослей наибольшее значение имеет *Ceratium hirundinella* – один из доминантов летнего планктона практически во всех типах водоемов умеренных широт. Vegetация *C. hirundinella* чаще всего связана с условиями стратификации вод; благодаря способности к вертикальным миграциям этот вид приобретает преимущество при дефиците биогенов в эпилимнионе. Как правило, популяция вида концентрируется в нижней части эпилимниона или в зоне термоклина, где достаточно благоприятные световые условия и имеются в наличии питательные вещества. Vegetация *Ceratium* продолжается с июня до конца августа с максимумом численности в середине лета.

В целом развитие *Ceratium* по мере эвтрофирования водоемов увеличивается. Этот вид может быть индикатором трофического статуса водоемов, т.к. удовлетворяет основным требованиям, предъявляемым к видам-индикаторам, - легкая их идентификация, сравнительно простой количественный учет и широкое распространение.

Используя данные уровня максимальной численности *Ceratium* И.С.Трифорова (1990) составила ориентировочную шкалу трофического статуса водоемов:

- олиготрофные водоемы – менее 10 тысяч кл/л;

- мезотрофные водоемы - 10-100 тысяч кл/л;
- эвтрофные водоемы – более 100 тысяч кл/л;
- высокотрофные водоемы – более 500 тысяч кл/л.

Из других динофитовых наиболее распространены виды рода *Peridinium*.

Некоторые из них – холодолюбивые, способные развиваться подо льдом в ранневесеннем планктоне всех климатических зон.

ВЕРТИКАЛЬНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ФИТОПЛАНКТОНА

Вертикальное распределение водорослей в толще воды позволяет им оптимально функционировать в наиболее благоприятных условиях среды. Оно определяется многими факторами, и в первую очередь, динамикой водных масс, прозрачностью, морфометрией водоемов, распределением биогенных элементов, температурным режимом и составом фитопланктона. Неоднородность в распределении водорослей в толще воды во многом связана с трофическим статусом водоема, который определяет видовой состав фитопланктона и его развитие в течение сезона.

Наиболее отчетливо неоднородность вертикального распределения фитопланктона выражена зимой и в ранневесеннем периоде, когда основная часть водорослей сосредоточена подо льдом, в наиболее благоприятных световых условиях (особенно при отсутствии снежного покрова) (Трифенова, 1979).

В некоторых озерах зимой и ранней весной подо льдом отмечается значительное количество фитопланктона. Этому способствуют солнечная радиация (при отсутствии снежного покрова) и повышенное содержание биогенных элементов, которые и способствуют развитию водорослей. Это чаще всего наблюдается в олиготрофных озерах, где летом развитие фитопланктона лимитируется низкой концентрацией биогенных элементов, тогда как зимой количество света и биогенов вполне достаточно для развития водорослей. К примеру, в Байкале подо льдом создается основная часть годовой продукции (Кожова, 1959; Поповская, Вотинцев, 1967). В подледном фитопланктоне (ранней весной) преобладают динофитовые (в частности, виды рода *Peridinium*), золотистые и криптонады, которые концентрируются в верхнем 2-метровом слое.

В олиготрофных озерах вертикальное распределение фитопланктона определяется световыми и гидрометеорологическими условиями. В период весенней и осенней циркуляций (при доминировании диатомовых водорослей) фитопланктон равномерно распределяется по всей глубине. Однако летом даже в условиях постоянного перемешивания вод вертикальное распределение фитопланктона неоднородно. Уже в конце мая-начале июня большая часть водорослей перемещается в верхние слои водоема; часть доминировавших в весенний период водорослей (и уже успевших осесть) наблюдаются в нижней части гипolimниона. Во второй половине лета большая часть водорослей концентрируется в нижней части эпилимниона, иногда максимум располагается в металимнионе или верхней части гипolimниона (Трифенова, 1979, 1990).

В мезотрофных водоемах в период весенней и осенней циркуляций и гомотермии (с преимущественным развитием диатомовых и золотистых водорослей), фитопланктон довольно равномерно распределяется в толще воды. С установлением температурной стратификации в июне водоросли в основной своей массе концентрируются в верхнем 6-метровом. Распределение водорослей в эпилимнионе относительно равномерно, однако к концу месяца намечается тенденция концентрирования водорослей в его нижней части. Иногда наблюдается скопление диатомовых в гипolimнионе, однако это обусловлено их оседанием в придонные слои после весенней вегетации.

В период летней стратификации разные виды водорослей сосредотачиваются в верхней, средней или нижней части эпилимниона. В штилевую погоду при массовом развитии синезеленых отмечается их концентрирование у поверхности, где они порой образуют плотные скопления. Подвижные формы (преимущественно виды из родов *Ceratium*, *Peridinium*, *Glenodinium*, *Dinobryon*, *Phacotus*, *Стуртомонас* и др.), способны выбирать оптимальные для жизнедеятельности условия в толще воды, поэтому их скопления могут наблюдаться не только на разных горизонтах эпилимниона, но и в более глубоких слоях. В целом вертикальное распределение водорослей в мезотрофных водоемах типично для большинства сравнительно глубоких озер.

В эвтрофных водоемах вертикальное распределение фитопланктона в значительной степени определяется их морфометрией. В больших по площади и в то же время мелких водоемах постоянное ветровое перемешивание водных масс приводит к равномерному распределению фитопланктона. Только при длительной штилевой погоде наблюдается скопление синезеленых водорослей у поверхности. В относительно глубоких эвтрофных водоемах распределение водорослей, так же как и в мезотрофных, приурочено к металимниону, что связано с наличием в этом слое достаточного количества биогенных соединений. В то же время в водоемах с низкой прозрачностью максимум биомассы имеет тенденцию тяготения к верхнему слою.

В высокотрофных водоемах преобладают подвижные формы водорослей. Во время устойчивой стратификации, максимум биомассы чаще всего приурочен к слою металимниона. Здесь отмечается высокая численность *Ceratium*, *Euglena*, видов рода *Peridinium* и *Trachelomonas*. Максимум численности синезеленых и золотистых водорослей имеет место в верхних слоях водоема. Ниже слоя скачка, в мета- и гипolimнионе, где часто отмечается дефицит кислорода, биомасса водорослей очень низкая, встречаются лишь немногочисленные эвгленовые и синезеленые (*Oscillatoria*, *Lyngbya*). В металимнионе эти синезеленые могут давать достаточно высокие численности (Hindak, Trifonova, 1989).

ФИТОПЛАНКТОН – КАК ИНДИКАТОР ТРОФИЧЕСКОГО СТАТУСА ВОДЕМОВ

По мере повышения трофности водоемов происходит увеличение биомассы синезеленых, а также повышается их доля в общей массе фитопланктона. То же самое происходит и с эвгленовыми водорослями; их биомасса максимальных значений достигает в высокотрофных озерах, а наибольшая доля в биомассе планктона - в загрязненных водоемах. Возрастает роль и значение зеленых, в основном хлорококковых водорослей.

Наоборот, доля диатомовых и золотистых в общей массе фитопланктона снижаются, хотя абсолютные величины их биомасс в эвтрофных водоемах все же выше, чем в мезотрофных.

Морфометрия озер, динамика водных масс и химический состав вод вносят некоторые изменения в общую схему развития водорослей в зависимости от трофического статуса водоемов. Так, в озерах с высокой проточностью доля диатомовых может превышать долю синезеленых даже в высокотрофных водоемах. Проточность, скорее всего, угнетающе действует на развитие синезеленых. Диатомовые, кроме того, преобладают в планктоне мезотрофных и слабоэвтрофных водоемов с повышенным содержанием кремния. Хризофитовые играют наибольшую роль в озерах, богатых кальцием. Динофитовые в большом количестве развиваются в стратифицированных озерах. Эти виды обладают способностью к вертикальным миграциям, что позволяет им выбирать наиболее благоприятные условия среды.

При эвтрофикации водоемов помимо общего повышения продуктивности фитопланктон в своем развитии проходит ряд стадий, в процессе которых меняется его видовой состав и количественные показатели. Кроме того, происходит смещение в создании большей части первичной продукции от ранневесеннего к летнему.

В ультраолиготрофных озерах (оз. Тахо в Калифорнии и оз. Верхнее в системе Великих озер Америки) доминируют мелкие диатомовые и хризофитовые, причем сезонная динамика их биомасс выражена крайне слабо (Goldman, Amezaga, 1975; Munawar, Munawar, 1978, 1986; Stoermer, 1978)).

В олиготрофных озерах с высокой прозрачностью и низким содержанием фосфора ($P_{\text{общ}}$ - менее 15 мкг/л) по биомассе преобладают хризофитовые, диатомовые и холодноводные перидинии. Сезонное их развитие характеризуется наличием всего одного весеннего пика биомассы, обусловленного вегетацией некоторых видов родов *Dinobryon*, *Peridinium*, *Chlamydomonas*. Очень часто эти виды развиваются еще подо льдом. Биомасса весеннего пика развития водорослей редко превышает 1 г/м³. В таких озерах большая часть годовой первичной продукции создается весной.

Летом в олиготрофных водоемах биомасса очень низкая (в пределах 0,05-0,3 г/м³), в планктоне вегетируют мелкие виды диатомовых, хризофитовых и хлорококковых водорослей. Развитие последних происходит в середине лета; в это время наблюдается появление *Scenedesmus* и других динофлагеллят. В августе-сентябре происходит снижение биомассы водорослей. Осенний фитопланктон в таких озерах

крайне беден. Средняя за сезон биомасса фитопланктона в олиготрофных озерах не превышает 1 г/м^3 .

Увеличение концентрации биогенов в водоемах (по мере повышения их трофности) приводит прежде всего к повышению биомассы фитопланктона во время его весеннего развития. В дальнейшем, по мере нарастания трофии, происходит уже повышение биомассы летне-осеннего фитопланктона.

Озера, находящиеся в начальной стадии эвтрофирования (с чертами олиготрофии), характеризуются высокой прозрачностью (более 3-4 м), повышенным содержанием биогенных элементов ($P_{\text{общ}}$ – до 20-30 мкг/л) и более высоким уровнем биомассы фитопланктона. В таких озерах преобладают диатомовые и хризофитовые водоросли, преимущественно видов родов *Melosira* и *Dinobryon*. В весенний и осенний период им сопутствуют динофитовые водоросли и криптонады. В период весеннего пика биомасса фитопланктона достигает $2-5 \text{ г/м}^3$.

В июне-июле низкая биомасса фитопланктона (менее $0,5 \text{ г/м}^3$) является результатом биогенного лимитирования за счет их исчерпания во время весеннего развития водорослей. В летнем планктоне (как и в олиготрофных озерах) преобладают мелкие диатомовые, золотистые и хлорококковые водоросли, в основном из родов *Cyclotella*, *Dinobryon*, *Oocystis*. В августе в небольшом количестве присутствует *Ceratium hirundinella*. В водоемах такого типа максимальная биомасса фитопланктона наблюдается во время его весеннего развития.

В типично мезотрофных озерах с более низкой прозрачностью (до 2 м) и достаточно высоким содержанием биогенов ($P_{\text{общ}}$ – более 30 мкг/л) доминируют диатомовые водоросли (до 80% общей массы фитопланктона). Им сопутствуют синезеленые, динофитовые и хризофитовые водоросли (до 25 % биомассы).

В сезонной динамике (в отличие от олиготрофных водоемов) отмечаются уже три и более пиков развития водорослей: весенний, осенний с преобладанием в планктоне диатомовых и хризофитовых водорослей (в основном видов рода *Melosira*, *Dinobryon* и др.) и летний - в июле-августе во время вегетации диатомовых (*Asterionella*, *Fragilaria*), некоторых синезеленых и *Ceratium*. Средняя за сезон биомасса фитопланктона составляет $2-4 \text{ г/м}^3$.

В мезотрофных водоемах продукция, создаваемая во время весеннего развития фитопланктона, все еще преобладает в годовом балансе. Однако по мере увеличения биогенной нагрузки происходит ее смещение в сторону летней первичной продукции. Это связано с развитием синезеленых и динофлагеллят, причем происходит увеличение не только продолжительности летнего пика биомассы, но и сокращается время между депрессиями в развитии фитопланктона.

В водоемах, находящихся на слабозвтрофной стадии (нечто среднее между мезо-и звтрофными), весенний пик развития диатомей все еще играет заметную роль в годовой продукции. Фитопланктон летом развивается достаточно слабо. Это связано с тем, что температурная стратификация вод не позволяет фитопланктону утилизировать биогенные соединения из гипolimниона. Средняя за сезон биомасса водорослей в этих озерах составляет 5-10 г/м³.

Эвтрофные озера характеризуются низкой прозрачностью (как правило ниже 1 м) и высоким содержанием биогенных элементов ($P_{\text{общ}}$ – более 50 мкг/л и выше 100 мкг/л в высокотрофных озерах). В фитопланктоне в течение вегетационного сезона постоянно доминируют синезеленые водоросли. Годовой максимум биомассы приурочен к периоду их наибольшего развития в июле-августе. Большую роль в биомассе планктона играют перидиней (в основном, *Ceratium*), хлорококковые и эвгленовые водоросли. Весной и поздней осенью доминируют диатомей, преимущественно виды из родов *Synedra*, *Stephanodiscus* и *Melosira*. Синезеленые водоросли, как правило, преобладают в небольших хорошо прогреваемых водоемах (до 75% биомассы фитопланктона), а динофлагелляты - в глубоких и стратифицированных (до 60% биомассы).

В мелководных высокотрофных озерах биомасса фитопланктона непрерывно возрастает с момента вскрытия озер, достигая максимума в середине лета. Биомасса водорослей остается высокой в течение всего вегетационного периода и, хотя смена доминирующих видов имеет место, существенных депрессий общей биомассы не происходит. Средняя за сезон биомасса в этих водоемах составляет 10-20 г/м³, а летняя - 50 г/м³ и выше.

Последняя стадия эвтрофирования – это гипертрофные водоемы. Они характеризуются резкой сменой доминирующих водорослей. Биомасса какого-то

вида (или нескольких видов) достигает максимальных значений, а затем происходит резкое их отмирание. Это связано не только за счет потребления биогенов. В таких водоемах сезонная сукцессия фитопланктона достаточно часто носит монодоминантный характер. Система становится нестабильной при критическом уровне средней биомассы около 20 г/м^3 и прозрачности 0,2-0,4 м.

Изложенная схема достаточно универсальна для олиготрофно-эвтрофной сукцессии водоемов умеренной зоны нашей страны. Однако специфические особенности разных регионов и конкретных водоемов накладывают отпечаток на ее характер. Несомненно, данная схема неприемлема, если эвтрофирование носит катастрофический характер.

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ПРЕСНОВОДНОГО ФИТОПЛАНКТОНА

ОТБОР ПРОБ ФИТОПЛАНКТОНА

Выбор метода отбора проб фитопланктона зависит от типа водоема, степени развития водорослей, имеющихся в наличии приборов и оборудования, а также - от экспериментальных задач.

Для количественного учета фитопланктона отбор проб производится специальными приборами – батометрами разнообразных конструкций (Рутнера, Мейера-Францева, Кожевникова, Дьяченко и др.). Их описания приведены в многочисленных руководствах (Киселев, 1969; Романенко, Кузнецов, 1974; Кузнецов, Дубинина, 1989).

Батометр опускают в воду и при достижении необходимой глубины сильным встряхиванием троса (или же посредством специального «посыльного груза») закрывают крышки отверстий одного или двух цилиндров (в зависимости от конструкции батометров). Затем батометр в закрытом виде извлекают на поверхность. При изучении фитопланктона поверхностных слоев водоема пробы отбирают, зачерпывая воду в сосуд определенного объема.

Для работы на пресных водоемах чаще всего используются 1-2-литровые батометры, а в морях – 2 и 5-литровые. В водоемах, бедных фитопланктоном, отбирают пробы объемом не менее 1 л. В водоемах, богатых фитопланктоном – 0,5 л, а при «цветении» воды – даже 0,25 л. Отбор проб батометрами позволяет отбирать

водоросли всех размерных групп, как для качественного, так и для количественного учета.

Для обнаружения малочисленных видов фитопланктона (к примеру, для флористико-систематических целей) проводят качественный лов планктона. Для этих целей используют планктонную сеть. Такая сеть состоит из металлического кольца и пришитого к нему мешка конической формы из мельничного шелкового или капронового сита № 77. Внизу сеть заканчивается стаканчиком, в который собирается планктон при фильтрации воды через сеть (Киселев, 1969). Для количественного учета водорослей планктонная сеть непригодна.

В практике гидробиологических исследований не существует общепринятого достаточно обоснованного приема выбора горизонтов для отбора проб фитопланктона. Поэтому применительно к водоему любого типа при выборе горизонтов руководствуются следующими рекомендациями (Федоров, 1979).

В мелководных водоемах глубина нижнего горизонта отбора проб – это их максимальная глубина. В глубоководных водоемах – это нижняя граница фотического слоя (глубина видимости диска Секки умноженная на 2). Остальные промежуточные горизонты определяются в зависимости от экспериментальных задач. Обычно число промежуточных горизонтов, включая поверхностный слой, не превышает 5-6. Желательно, чтобы отбор проб проводился в слое температурного скачка, над и под ним (Киселев, 1969).

Иногда в водоеме (особенно в мелководном) отбирают интегрированные пробы фитопланктона. Батометром (длина которого чаще всего 0,5 м) последовательно отбирают пробы через каждые 0,5 м до максимальной глубины, (то есть облавливают всю водную толщу до дна). Если такой тотальный отбор проб затруднен, можно отбирать серию проб с пропуском в 1 метр (но не более). Отобранные пробы сливают в сосуд (или сосуды) и после перемешивания берут интегрированную пробу для последующего анализа. Чаще всего при таком способе отбора проб исследуются 1-2 пробы эпилимниона (верхний и нижний слой), одна проба из металимниона и одна – из верхнего слоя гипolimниона.

При сетном сборе фитопланктона в планктонную сеть попадают только колонии и крупные клетки водорослей, тогда как клетки небольших размеров

«проскакивают» через фильтрационную поверхность сита (размер ячеи около 70 мкм). Планктонная сеть используется только для качественного лова водорослей; она облавливает большие объемы воды, что позволяет выявлять виды, встречающиеся в водоеме в незначительных количествах. Поэтому обловы фитопланктона сетью должны сочетаться с пробами, собранными с помощью батометра. Это позволяет более полно исследовать фитопланктон.

Сгущение количественных проб фитопланктона чаще всего осуществляется двумя методами – осадочным и фильтрационным (см. ниже).

Для изучения вертикальных миграций водорослей в толще воды выбирают одну (или несколько) наиболее характерных станций и отбирают по горизонтам серию проб, причем расстояние между точками делают как можно частыми. Наблюдения проводят в течение нескольких суток, при повторении отбора проб через каждые 4-5 часов.

ВЫБОР СТАНЦИЙ ОТБОРА ПРОБ

Вполне естественно, что обследовать всю водную массу водоема совершенно невозможно. Поэтому всегда применяют метод выборочного обследования, при котором отбирают пробы на станциях, расположенных в разных частях водоема (Кузьмин, 1975).

Выбор станции, т.е. пункта отбора проб, определяется морфометрией водоема и преследует цель возможно полнее охватить экологически разнообразные участки. Местоположение станций зависит, прежде всего, от расположения источников загрязнения на его водосборной площади. Отбор проб осуществляется на участках до и после этих источников (крупных населенных пунктов, промышленных и сельскохозяйственных комплексов). Количество проб, отбираемых на участке реки, расположенном ниже источника загрязнения, должно значительно превышать количество проб, взятых выше источника.

Учитывая, что влияние промышленных и бытовых стоков на фитопланктон сказывается только через 2-3 суток, по скорости течения реки рассчитывают место размещения станций и створов. Так, при скорости течения у исследуемого пункта 0,5

м/с первый створ (трансекту) целесообразно заложить через 43 км, второй – через 86 км, а третий – через 130 км, что соответствует расстоянию, пройденному водной массой, соответственно, за 1, 2 и 3 суток. При исследовании влияния сточных вод в малопроточных или непроточных водоемах трансекты закладываются с учетом ветровых сносов (Руководство по гидробиологическому мониторингу ..., 1992).

При работе на озерах и водохранилищах необходимо исследовать впадающие в них реки и основные заливы. На остальной акватории, если она невелика (например, на Можайском водохранилище) достаточно наметить 5-7 станций, расположенных равномерно по водоему. На крупных озерах и водохранилищах применяют трансектирование акватории, причем число станций на трансектах должно быть пропорционально площади водоема.

Выбор количества станций на площади водоема в основном определяется задачами исследований, техническими возможностями, а также наличием достаточного количества специалистов (в частности, альгологов.)

ОБОР ПРОБ ПЕРИФИТОНА (ОБРАСТАТЕЛЕЙ)

Отбор проб перифитона (обрастателей) с поверхности камней, гидротехнических сооружений, стеблей и листьев растений осуществляется с помощью обычного ножа или специальных скребков или ложек. Однако при этом часть материала гибнет или уносится токами воды; кроме того, нарушается картина распределения компонентов биоценоза. Поэтому лучше всего собирать водоросли перифитона вместе с субстратом, который полностью или частично извлекают из воды и помещают в специально приготовленный для этого сосуд.

Субстрат заливают небольшим количеством фильтрованной воды (взятой из того же водоема) для дальнейшего изучения собранного материала в живом состоянии. При необходимости материал фиксируют 4%-ным раствором формальдегида.

Для количественного учета водоросли смывают с поверхности извлеченного субстрата с помощью воды и щеточки над широким сосудом. Измерив объем смыва, переносят его в приготовленную для пробы посуду. Количественный учет

водорослей осуществляется в соответствии с методикой учета фитопланктона. Кроме объема смыва необходимо знать размер площади субстрата, с которой были собраны водоросли.

При изучении эпифитных водорослей, собранных со стеблей и листьев водных растений, количественный учет ведется в расчете не только на единицу площади, но и на единицу массы растения-субстрата.

ОТБОР ПРОБ ФИТОБЕНТОСА

Существующие методы отбора проб фитобентоса предусматривают сбор водорослей, обитающих на поверхности донных грунтов и отложений, в их толще (глубиной до 1 см) и в придонном слое воды толщиной 2-3 см (Топачевский, Масюк, 1984).

Для изучения видового состава фитобентоса достаточно извлечь на поверхность некоторое количество донного грунта и отложений на нем.

На мелководьях (глубиной до 0,5-1 м) это достигается с помощью опущенной на дно пробирки или сифона – резинового шланга со стеклянными трубками на концах, в который засасывают наилок.

На больших глубинах количественные пробы отбирают с помощью ведерка или стакана, прикрепленного к песту, а также различными грабельками, драгами, дночерпателями, илососом.

Для отбора количественных проб фитобентоса используют микробентометр Владимировой. Основная его часть представляет собой латунную трубку длиной 25-30 см с внутренним диаметром 4-5 см. На верхнем конце этой трубки находится втулка с конусообразной воронкой, в которую на рычаге герметически входит притертая крышка-клапан (Топачевский, Масюк, 1984).

Трубку с открытой крышкой на деревянной штанге опускают на дно и врезают заточенным нижним концом в толщу грунта на несколько сантиметров. Потянув за веревку, закрепленную на свободном конце рычага, закрывают верхнюю втулку трубки крышкой, после чего прибор осторожно извлекают на поверхность.

При выходе трубки из воды нижнее отверстие трубки закрывают ладонью,

чтобы не допустить выпадение грунта. Открыв крышку, осторожно сливают верхние слои воды в стеклянную посуду до появления муты (в дальнейшем эту часть воды выливают).

Оставшуюся в трубке воду, ил и грунт легко встряхивают и переносят в приготовленную посуду, предварительно измерив ее объем.

Микробентометр Владимировой удобен при работе на глубинах до 2-2,5 м. Другая модель - микробентометр Травянка, Евдокимовой - позволяет отбирать пробы с любых глубин (Топачевский, Масюк, 1984). В данной конструкции верхний клапан закрывается автоматически после удара прибора о грунт. Прибор извлекают на поверхность; при выходе его из воды нижнее отверстие трубки закрывают ладонью. Остальная процедура отбора пробы идентична той, которая используется при работе с прибором Владимировой.

КОНСЕРВАЦИЯ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ ФИТОПЛАНКТОНА

Для консервирования и предохранения фитопланктона от разрушения при длительном хранении используются разнообразные химические соединения и их смеси.

Консервацию осуществляют сразу же после отбора проб добавлением к ним фиксирующего реагента. Поскольку ни один из применяемых фиксаторов не может быть предпочтен всем прочим, важно учитывать достоинства и недостатки каждого при использовании их в повседневной работе. Ниже приводим прописи фиксирующих растворов, взятых из ряда методических руководств (Методика изучения биогеоценозов..., 1975; Федоров, 1979; Топачевский, Масюк, 1984 и др.).

Хорошую сохранность водорослей обеспечивает **раствор формальдегида и хромовых квасцов** (1 мл 4%-ного формальдегида и 10 г $K_2SO_4 \cdot Cr(SO_4)_3 \cdot 24H_2O$ в 100 мл пробы). Такие пробы могут сохраняться достаточно долго без заметного разрушения клеток фитопланктона. Исключение составляют жгутиковые водоросли, нежные клетки которых довольно быстро разрушаются после фиксации формалином.

Раствор Люголя является хорошим фиксатором, и его используют, если количественная обработка проб осуществляется не позже трех месяцев с момента

фиксации проб. При его употреблении в пробах хорошо сохраняются нежные формы фитопланктона. Кроме того, использование этого фиксатора позволяет (благодаря контрастированию препарата йодом) обнаруживать пиреноиды, жгутики, слизь и чехлы вокруг клеток. Фиксированные пробы необходимо хранить в темноте. Для приготовления раствора Люголя используют 15 г KJ, который растворяют в 50 мл дистиллированной воды, добавляют 10 г кристаллического йода и доводят раствор дистиллированной водой до общего объема 500 мл. Расход фиксатора составляет 2 мл на 100 мл пробы.

Раствор Люголя и ацетата натрия способствует контрастированию просматриваемого под микроскопом препарата, что особенно важно при наличии в пробе мелких жгутиковых водорослей. Фиксированные данным препаратом пробы хранятся не более трех месяцев. Для приготовления фиксатора 10 г KJ растворяют в 70 мл дистиллированной воды, затем добавляют 5 г кристаллического йода и 5 г ацетата натрия (CH_3COONa). Для фиксации 100 мл пробы используют 0,2 мл фиксирующего раствора.

Раствор Люголя с уксусной кислотой удлиняет срок сохранности фиксируемой пробы до одного года. Однако необходимо иметь в виду, что подкисление проб приводит к разрушению нежных водорослей и растворению оболочек у некоторых жгутиковых. Для приготовления фиксатора используют 20 г KJ, который растворяют в 200 мл дистиллированной воды, добавляют 10 г кристаллического йода и 20 г ледяной уксусной кислоты (CH_3COOH). Для фиксации 100 мл пробы используют 1 мл фиксатора.

Раствор Люголя с хромовой кислотой позволяет достаточно “мягко” фиксировать фитопланктон и в то же время достаточно долго сохраняет водоросли. Хромовая кислота ведет к уплотнению клеток, а уксусная, наоборот, приводит к разбуханию их. Фиксатор не растворяет слизистые оболочки водорослей, сохраняет и оттеняет жгутики и пиреноиды и незначительно деформирует нежные клетки. По сравнению с другими фиксаторами на основе Люголя он имеет преимущество, т.к. введенный в него формалин предохраняет пробу от загнивания при длительном хранении.

Фиксатор состоит из двух растворов, которые готовятся отдельно, а потом

сливаются и хранятся в темной склянке. Раствор № 1: 10 г – КJ, 50 мл дистиллированной воды и 5 г кристаллического йода. Раствор № 2: 5 мл - 1%-ная хромовая кислота, 10 мл - ледяная уксусная кислота, 80 мл 40%-ного формальдегида. Вначале в пробу добавляют 1-2 капли фиксатора, а через 2-3 часа – доводят ее концентрацию до цвета темного чая (Кузьмин, 1975). Бентосные пробы с большим количеством органического вещества через несколько недель желательно дофиксировать несколькими каплями формалина.

Раствор Кифа является “мягким” фиксатором и надежно сохраняет нежные формы фитопланктона от разрушения. При низкой температуре в темноте пробы могут храниться до 3 лет, а при комнатной температуре – до 6-8 месяцев. Для приготовления раствора Кифа используют 900 мл 50%-ного этанола, 50 мл 40%-ного формальдегида, 25 мл глицерина, 100 г CuCl_2 и 15 г уранил-нитрата. Для фиксации 100 мл пробы используют 5 мл раствора Кифа.

Все законсервированные пробы фитопланктона независимо от использованного фиксатора необходимо хранить в плотно закрытых сосудах в затемненном месте при сравнительно низкой температуре.

КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ ПРОБ ФИТОПЛАНКТОНА

В водоеме (в том числе и в отобранной пробе воды) концентрация отдельных видов водорослей различается на несколько порядков величин. Кроме того, сама численность водорослей, за исключением отдельных видов во время их «цветения», очень низка. Поэтому подавляющее число видов водорослей практически невозможно учесть без их предварительного концентрирования.

Использование того или иного метода связано, прежде всего, с задачей экспериментатора, исходной концентрацией водорослей, наличия соответствующего оборудования, удаленностью от стационарной базы (лаборатории), где проводится работа по изучению фитопланктона, и др.

В настоящее время в гидробиологической практике широко используются несколько способов (методов) концентрирования проб фитопланктона; это, прежде

всего, осаджение водорослей в сосудах, фильтрация через сита или мембранные фильтры и центрифугирование собранного материала. Первые два метода дают примерно одинаковые результаты. У каждого из этих методов имеются свои достоинства и недостатки.

В гидробиологической практике широко используется наиболее простой осадочный метод (= метод отстаивания проб в сосудах), предложенный в 1915 г. Р.Г.Гринбергом и модифицированный П.И.Усачевым. Он не требует сложного оборудования.

Фиксированные пробы отстаивают в сосудах (бутылках или цилиндрах) в неподвижном состоянии в темном месте. При объеме пробы 2 л время отстаивания составляет 12-15 суток, при 1 л – 8-10 сут., 0,5 л – 7 сут., 0,2 л – 4 суток. Мелкие водоросли оседают с очень низкой скоростью, порядка 5 мм в час, поэтому при расчете времени отстаивания пробы необходимо руководствоваться этими значениями. За это время водоросли успевают осесть на дно сосуда (за исключением тех, которые всплывают к поверхности). Выбор объема сосуда для отстаивания водорослей определяется в основном их концентрацией в водоеме; для мезо- и эвтрофных водоемов чаще всего используют 0,5-литровые бутылки.

Время отстаивания может быть сокращено благодаря применению жидких детергентов; после фиксирования пробы (перед их отстаиванием) в нее добавляют бытовой жидкий детергент (из расчета 20 мл на 1 л пробы). В этом случае время осадения сокращается в 3-4 раза. Однако необходимо иметь в виду, что пробы с детергентом быстро разрушаются, поэтому они должны быть обработаны сразу же после их концентрирования.

После осадения водорослей пробу концентрируют путем сливания среднего слоя воды, при скорости падения уровня в пробе менее 3 см/ч, до объема 30-80 мл (из первоначального объема 0,5-1 л). Необходимо быть крайне осторожным, чтобы не нарушить осадка и не допустить засасывания водорослей из поверхностного слоя. Для этого используют тонкий стеклянный сифон с загнутым на 2 см вверх концом. Один конец трубки затянут мельничным ситом (номера 70- 77) в несколько слоев; второй – соединен с резиновым шлангом. Сгущенную таким способом пробу взбалтывают и, замерив ее объем, переносят в сосуд меньшего объема. При

необходимости пробу концентрируют до объема 5-10 мл центрифугированием (1000-2000 об./мин в течение 5-10 мин). Полученный таким способом материал годен для микроскопического исследования в счетной камере (Федоров, 1979).

Далее пипеткой с широким носиком часть концентрированного материала переносят в счетную камеру. Чтобы достичь равномерного распределения водорослей в пробе, ее необходимо осторожно и в то же время тщательно перемешать (вращением «восьмеркой» или продуванием воздуха). При тщательном перемешивании сконцентрированной пробы и быстром заполнении счетной камеры взмученными водорослями ошибка в определении их численности составляет 20%, тогда как при небрежном выполнении этой операции ошибка может возрасти до 30% (Федоров, 1979).

Метод фильтрации проб через мембранные фильтры пригоден для концентрирования живых и фиксированных водорослей. Этот метод широко используется в экспериментах (чаще всего в «поле»), где нет условий для длительного отстаивания отобранных проб в сосудах. Кроме того, он удобен для концентрирования водорослей с твердыми и жесткими створками и оболочкой (диатомовых, динофитовых и др.). Объем фильтруемой пробы зависит от двух условий: от концентрации водорослей и плотности фильтра. Поэтому просмотр живого материала пробы должен предшествовать процедуре фильтрации.

Для фильтрации может быть использован любой источник вакуума, обеспечивающий разрежение порядка 0,2-0,3 атм. Проводить фильтрацию при более высоком вакууме не рекомендуется, т.к. при этом разрушаются клетки нежных форм водорослей. Чаще всего для этих целей используют мембранные фильтры с порами 1,5 и 2,5 мкм, а если размеры водорослей очень малы, то – 0,2-0,6 мкм. Иногда используют комбинированный способ; в начале пробу фильтруют через мембранный фильтр с порами 3-5 мкм, а фильтрат с мелкими водорослями – через фильтры с порами 0,2 мкм.

Фильтрационный метод концентрирования фитопланктона оказывается удобным при обработке проб с низким содержанием солей, детрита, минеральной взвеси и малой концентрации самих водорослей (т.е., в олиготрофных водоемах). В противном случае при использовании этого метода появляется ряд неудобств,

осложняющих процесс фильтрации и идентификации водорослей:

- поры фильтра «закупориваются» суспензируемым материалом, что резко замедляет скорость фильтрации;
- задержанные фильтром частицы взвешенного в воде материала мешают микроскопированию препарата;
- очень часто клетки водорослей «накладываются» друг на друга, что мешает установлению их таксономической принадлежности.

Поэтому количественный учет водорослей на фильтрах в связи с перечисленными выше трудностями, как правило, позволяет получать результаты с недостаточно высокой точностью.

Фильтрацию живой пробы лучше всего осуществлять таким образом, чтобы можно было, не доводя процесс фильтрации до конца, ресуспензировать концентрируемый материал в небольшом объеме оставшейся пробы. Эту пробу в дальнейшем просматривают в живом виде или консервируют фиксирующим раствором. Хранят пробы в темном и прохладном месте.

Необходимо обратить внимание, что при использовании данного метода возникают трудности, связанные с отделением (очищением) водорослей от поверхности фильтра. Некоторые водоросли так «забиваются» в поры, что их невозможно смыть водой и очистить с помощью мягкой кисточки. Кроме того, часть водорослей «налипает» на кисточку и теряется.

Размер таких потерь варьирует в зависимости от качества поверхности фильтра, размера пор, размерных характеристик водорослей и режима фильтрации (Федоров, 1969).

Метод центрифугирования применяется для концентрирования живого материала, чаще всего густых проб фитопланктона или при работе с культурами водорослей. В таком сконцентрированном материале возможен учет жгутиковых и других мелких и подвижных водорослей.

Концентрирование достигается центрифугированием 20-50 мл пробы (в зависимости от объема центрифужных пробирок и концентрации водорослей в пробе) в течение 20-30 мин при 1000-2000 об/мин. Супернатант осторожно удаляют сифоном, оставляя 1/10 – 1/50 часть первоначального объема. Осадок

ресуспензируют круговым помешиванием в оставшемся объеме воды, и просматривают в счетной камере.

Осаждение водорослей облегчается добавлением в пробу коагулянта (1%-ного раствора $Al_2(SO_4)_3$ или $Al(OH)_3$) из расчета 1 мл раствора на 10 мл пробы.

Метод двойной фильтрации (Сорокин, 1962, 1966) применяется при необходимости концентрирования водорослей из больших объемов воды (10-20 л), чаще всего морского фитопланктона. Этот процесс осуществляется с помощью медленной обратной фильтрации живых водорослей через нейлоновое сито (ячей 10-15 мкм) в специальной воронке (Федоров, 1979). После окончания фильтрации сконцентрированную таким способом пробу фитопланктона сливают в сосуд. Оставшиеся на сите водоросли также смывают в сосуд; полноту смыва фитопланктона контролируют, просматривая влажное сито под бинокляром. Сконцентрированную таким способом пробу фитопланктона (до объема 50-70 мл) фиксируют одним из фиксаторов и измеряют ее объем в мерном цилиндре.

Для учета мелких форм водорослей (прошедших через нейлоновое сито) пробу повторно фильтруют (так же без применения вакуума) в специальной воронке на нейлоновый фильтр диаметром 45 мм (размер пор 5 мкм) (Федоров, 1979). Фильтрацию останавливают, когда над фильтром остается небольшой объем воды. Нейлоновый фильтр имеет гладкую поверхность, и клетки фитопланктона легко смываются с него кисточкой. Осторожным перемешиванием водоросли взмучивают с фильтра и переносят в пробирку (для последующего просмотра живой пробы или консервирования).

МЕТОДЫ ОКРАСКИ КЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР ВОДОРΟΣЛЕЙ

Собранный материал предварительно просматривают под микроскопом в живом виде в день сбора, чтобы отметить качественное его состояние до наступления изменений, вызванных хранением живых водорослей или фиксацией проб. В дальнейшем живой материал продолжают изучать параллельно с фиксированным.

Работа с живым материалом является необходимым условием успешного изучения эвгленовых, криптофитовых, золотистых, многих зеленых, желтозеленых и

других водорослей, изменяющих форму тела, форму и окраску хлоропластов, теряющих жгутики или даже полностью разрушающихся.

Чтобы сохранить собранный материал живым, его следует всячески оберегать от перегрева; необходимо хранить в темном прохладном месте. Изучение проводят сразу же после отбора проб.

Ниже приводятся методы окраски клеточных структур водорослей, взятых из методического руководства А.В.Топачевского, Н.П.Масюк (1984).

Для микроскопического изучения водорослей готовят препараты: на предметное стекло наносят каплю исследуемой жидкости и накрывают ее покровным стеклом. При длительном изучении препарата жидкость под покровным стеклом постепенно подсыхает, и ее следует добавлять. Для уменьшения испарения по краям покровного стекла наносят тонкий слой парафина или вазелина.

При необходимости длительных наблюдений над одним и тем же объектом хороший результат дает **метод висячей капли**.

На чистое покровное стекло наносят каплю исследуемой жидкости. Затем покровное стекло (края которого покрыты парафином, парафиновым маслом или вазелином) накладывают каплей вниз на специальное предметное стекло с лункой посередине так, чтобы капля не касалась дна лунки. Такой препарат можно изучать в течение нескольких месяцев, сохраняя его в перерывах между работой во влажной камере (экзикаторе).

При изучении водорослей, имеющих монадное строение, серьезной помехой является их подвижность. Замедлению движения способствует добавление в пробу вишневого клея. Кроме того, при подсыхании препарата движение постепенно замедляется и даже приостанавливается.

Подвижные водоросли рекомендуется фиксировать парами оксида осмия (1У) (при этом у них хорошо сохраняются жгутики), кристаллического йода, 40%-го формальдегида, слабым раствором хлоралгидрата или хлороформа. Длительность экспозиции над парами фиксаторов устанавливают экспериментально, в зависимости от специфики объекта. Препараты следует изучать сразу же после фиксации, т.к., в течение короткого периода времени водоросли (особенно лишённые клеточных оболочек) деформируются.

Во многих случаях прибегают к цитологическим методам изучения материала. При изучении внутриклеточных структур, особенно у мелких жгутиковых, применяют прижизненное окрашивание с помощью слабых растворов (0,005-0,01%) нейтрального красного, метиленового голубого, нейтрального голубого, трипанового красного, бриллиант-крезилового синего, конго красного, зелени Януса, позволяющих более четко выявить клеточную оболочку, папиллы, слизь, вакуоли, митохондрии, аппарат Гольджи и другие органеллы.

Многие красители дают хороший результат лишь после применения специальных методов фиксации. Необходимо иметь в виду, что при изучении фиксированных формальдегидом проб успешное применение красителей возможно только после тщательного отмывания исследуемого материала дистиллированной водой.

Самый лучший фиксатор для цитологического исследования водорослей, в том числе изучения их структуры, - 1-2%-й раствор оксида осмия (1У) (необходимо иметь в виду, что раствор не подлежит длительному хранению). Водоросли, не имеющие клеточных оболочек, хорошо и быстро фиксируются метанолом. Раствор Люголя (1 г йодида калия и 1 г кристаллического йода в 100 мл воды) не только хорошо фиксирует водоросли, но и окрашивает крахмал в синий цвет.

Для изучения ядер водорослей используют спиртово-уксусный фиксатор Кларка (три части 96%-ного этилового спирта и одна часть ледяной уксусной кислоты) или жидкость Карнуа (шесть частей 96%-ного этилового спирта, три части хлороформа и одна часть ледяной уксусной кислоты). Водоросли выдерживают в свежеприготовленном растворе фиксатора в течение 1-3 часов, затем промывают 96%-ным этиловым спиртом (2 мин) и водой (10 мин).

При окраске ядер ацетокарминовым методом предварительной фиксации спиртово-уксусным фиксатором подвергаются лишь водоросли, имеющие толстые клеточные оболочки.

Для подготовки красителя 2 г кармина кипятят в 400 мл 45%-ной уксусной кислоты в течение 4 ч, пользуясь обратным холодильником. Полученный темно-красный раствор охлаждают, фильтруют и хранят неограниченно долго в сосуде из темного стекла.

Для окрашивания водорослей на предметном стекле добавляют немного красителя, покрывают его покровным стеклом и наблюдают окрашивание под микроскопом. Этим препаратом кроме ядер окрашивают базальные тельца жгутиков, вакуоли и пиреноиды.

Для изучения химической природы клеточной оболочки используют 0,01%-й раствор рутин красного (у данного красителя реакция на пектиновые вещества) и хлор-цинк-йод (20 г хлорида цинка, 6,5 г йодида калия, 1,3 г кристаллического йода в 10,5 мл воды), которые окрашивают целлюлозу в синий цвет.

Для выявления структуры поверхности клеточной оболочки и папилл пользуются 0,1%-ным раствором генцианвиолета, хорошо окрашивающим также слизь.

Для обнаружения слизистой оболочки, кроме того, применяют тушь, которая, не проникая внутрь слизи, делает ее хорошо заметной.

Детали структуры поверхности клеточных покровов хорошо видны в 5%-ом водном растворе нигрозина. Для изучения строения клеточных оболочек нитчатых водорослей их обрабатывают раствором КОН, а затем окрашивают конго красным.

Жгутики (табл. 1) окрашивают с помощью окраски по Лефлеру. Для этого водоросли фиксируют оксидом осмия (1У), на короткое время погружают в абсолютный спирт и оставляют сохнуть. Затем добавляют несколько капель красителя (смесь 100 мл 20%-ного водного раствора танина, 50 мл насыщенного водного раствора $FeSO_4$ и 10 мл насыщенного спиртового раствора основного фуксина) и нагревают под пламенем горелки, не доводя до кипения, до появления пара. Затем препарат ополаскивают дистиллированной водой и в течение 10 мин докрашивают карболфуксином (100 мл 5%-го водного раствора свежеперегнанного фенола и 10 мл насыщенного спиртового раствора фуксина основного; смесь отстаивают в течение 48 ч, фильтруют и хранят в течение длительного времени), затем снова ополаскивают дистиллированной водой, дают высохнуть и заключают в канадский бальзам. Этим методом можно установить наличие или отсутствие на жгутиках **волосков**.

Хлоропласты (табл. 2) следует изучать на живом материале, т.к. при фиксации они деформируются. Кроме того, трудно сохранить **стигму**. Белковое тело **пиреноида** после предварительной фиксации хорошо окрашивается по **Альтману**. Краситель состоит из одной части насыщенного раствора **пикриновой кислоты** в абсолютном этиловом спирте, семи частей 50%-го этилового спирта и одной части насыщенного водного раствора **фуксина**. Окрашивание длится не менее 2 ч.

Окраску **белковых тел пиреноидов** можно осуществить и без предварительной фиксации материала с помощью **уксусного азокармина G**. Для этого к 4 мл ледяной уксусной кислоты добавляют 55 мл воды и 5 г азокармина G. Полученную смесь кипятят около 1 часа, пользуясь обратным холодильником, охлаждают, фильтруют и хранят в сосуде из темного стекла.

Таблица 1. Особенности строения жгутиков в разных отделах водорослей

Отделы водорослей	Число жгутиков	Длина		Форма		Поверхность жгута			Особенности тонкого строения (с. ж. — стержень жгута; п. з. — переходная зона)
		наконечные	гетероконтные	изоморфные	гетероморфные	с микроскопическими	с шипами	глазками	
Зеленые	2 — много	+		+		+	+	+	Звездчатое тело (п. з.) Спиральное тело (п. з.)
Золотистые	2(1) — 3 (гаптонома)		+		+	+	+		
Желтозеленые (разожгутиковые)	2		+		+	+		+	
Диатомовые	1					+			(9—9)+0 (с. ж.)
Бурые	2(1)		+		+	+		+	Двойное спиральное тело
Эвгленовые	1—7		+	+		+			

Раствор красителя добавляют в каплю воды с водорослями на предметном стекле, накрывают покровным стеклом и наблюдают под микроскопом. Белковое тело **пиреноида** окрашивается в интенсивно красный цвет, остальная часть клетки — в светло-розовый.

Крахмал окрашивается в синий цвет под действием любых реактивов, содержащих йод (в том числе, раствора Люголя). Наиболее чувствительный из них — **хлорал йода** (мелкие кристаллы йода в растворе хлоралгидрата). Он позволяет

обнаружить наиболее мелкие зернышки крахмала и отличить крахмал вокруг пиреноида от строматического.

Таблица 2. Основные особенности строения хлоропластов, характерные для разных отделов зукариодных водорослей

Отделы водорослей	Хлоропластные ламеллы			Оболочка хлоропластов		Запасные продукты	
	Число тилакоидов на ламеллу	Наличие периферических выростов ламеллы	Главные хлорофиллы	Число мембран вокруг хлоропласта	Наличие мембранной оболочки митохондриальной сети	Главное запасное вещество	Крахмал внутри хлоропласта
Красные	1	±	a, d	2	—	Багрянковый крахмал	—
Зеленые	2 — много	—	a, b	2	—	Крахмал	+
Золотистые	3	+	a, c	4	+	Хризоламминарин	—
Желтозеленые	3	+	a, c	4	+	»	—
Диатомовые	3	+	a, c	4	+	»	—
Бурые	3	+	a, c	4	+	Ламинарин	—
Пиррофитовые	3	—	a, c	3	—	Крахмал	—
Эвгленовые	3	—	a, b	3	—	Парамилон	—

Масло и жиры окрашиваются суданом 111 (0,1 г судана 111 в 20 мл абсолютного этилового спирта) в красный цвет или оксидом осмия (1У) – в черный цвет.

Вакуоли с клеточным соком становятся более заметными благодаря прижизненной окраске слабым раствором нейтрального красного.

Пульсирующие вакуоли можно наблюдать на живом материале в световом микроскопе благодаря их периодическому наполнению и опорожнению. Применение фазово-контрастного устройства, добавление 1%-ного водного раствора танина, а также фиксация материала оксидом осмия (1У) облегчает выявление этих органелл.

Митохондрии хорошо окрашиваются при свободном доступе кислорода 0,1%-ным раствором зелени Януса. Поэтому каплю воды с водорослями на предметном стекле накрывают покровным стеклом лишь спустя некоторое время после добавления красителя.

Аппарат Гольджи при фиксации материала оксидом осмия (1У) темнеет. Его можно окрасить также раствором трипанового голубого; 0,01%-й водный раствор

метиленового голубого окрашивает содержимое клетки в синий цвет, в то время как аппарат Гольджи остается бесцветным.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПОСТОЯННЫХ ПРЕПАРАТОВ ВОДОРОСЛЕЙ

Для приготовления постоянных препаратов используют **глицерин-желатину**. Одну весовую часть желатины настаивают в шести весовых частях дистиллированной воды в течение нескольких часов, затем добавляют семь весовых частей чистого глицерина и кристаллик антисептика (тимол, карболовая кислота). Смесь нагревают на водяной бане, помешивая стеклянной палочкой до полного растворения желатины. Для осаждения мути в смесь добавляют сырой яичный белок и фильтруют через бумажный фильтр, пользуясь воронкой для горячего фильтрования и часто меняя бумагу. Остывшая глицерин-желатина должна быть прозрачной. При дальнейшем употреблении ее расплавляют нагреванием на водяной бане.

Глицерин-желатина хорошо смешивается с водой, поэтому при ее применении отпадает необходимость продолжительной сушки материала. Для приготовления постоянных препаратов водоросли помещают в каплю глицерина и на некоторое время оставляют подсохнуть. Затем каплю расплавленной глицерин-желатины наносят на нагретое предметное стекло, переносят в нее водоросли и накрывают покровным стеклом. После полного застывания глицерин-желатины края покровного стекла покрывают лаком. Такие препараты можно хранить в горизонтальном положении в течение нескольких лет.

Еще дольше сохраняются препараты, заключенные в **канадский бальзам**. Перед заключением в канадский бальзам материал должен быть полностью обезвожен проводкой через спирт (возрастающей крепости до абсолютной) и гвоздичное масло или ксилол, которые способствуют его просветлению. Материал, окрашенный методом Гимза, помещают в канадский бальзам, со временем застывающий, в котором краски сохраняются неограниченно долго.

Метод Гимза позволяет окрашивать ядра и другие клеточные органеллы. Водоросли, лишённые клеточной оболочки, фиксируют метанолом или оксидом осмия (1У); остальные – окрашивают после гидролиза оксидом хлороводорода.

Перед окрашиванием рекомендуется в течение нескольких минут подвергать материал воздействию слабой HCl при 60°C. Затем кислоту тщательно промывают дистиллированной водой. Для окраски используют разбавленный краситель: 1-2 капли основного красителя в 1 мл воды; время окрашивания 20-60 минут. Окрашенные препараты быстро ополаскивают дистиллированной водой, проводят через безводный ацетон, смесь ацетона и ксилола в соотношении 2:1, ацетона и ксилола в соотношении 1:2, ксилол и заключают в канадский бальзам. Ядерный хроматин и хромосомы окрашиваются в красный до красно-фиолетового, ядрышки – в синий, хлоропласты – в светло-синий (пиреноиды остаются бесцветными), а жгутики и их базальные тельца – в светло-красный цвет.

При изучении десмидиевых и панцирных динофитовых водорослей, систематика которых базируется на строении клеточных оболочек и панцирей, материал обрабатывают жавеловой водой, способствующей его осветлению. Для приготовления жавеловой воды в 100 частях воды растирают 20 частей хлорной извести, доливают 100 частей 15%-го раствора карбоната калия и отстаивают в течение нескольких часов, после чего смесь многократно взбалтывают и фильтруют. К фильтрату постепенно добавляют раствор карбоната калия до прекращения появления осадка. После повторной фильтрации жидкость сливают в плотно закрывающийся сосуд из темного стекла и хранят в темноте.

Исследуемый материал центрифугируют, осадок заливают на 1-2 суток жавеловой водой и плотно закрывают сосуд пробкой. Обработанный таким образом материал 2-3 раза отмывают дистиллированной водой. Панцири диатомовых водорослей для выявления их структуры рекомендуют после просветления жавеловой водой подкрашивать трипановым голубым или спиртовым раствором йода.

Систематика диатомовых водорослей базируется на структуре их панциря. Поэтому подготовка диатомовых к микроскопированию сводится к уничтожению всех органических веществ, затемняющих структуру панциря. Это достигается либо прокаливанием материала, либо обработкой концентрированными минеральными кислотами, в частности серной.

При использовании первого метода каплю освобожденной от примесей суспензии диатомовых водорослей наносят на чистое обезжиренное стекло и, поместив на слюдяную пластинку, прокалывают над пламенем горелки или на электрической плитке до полного сгорания всех органических веществ (в течение 0,5 часа и более). Метод прокалывания позволяет сохранить наиболее мелкие и нежные панцири планктонных видов водорослей и требует небольшого количества исследуемого материала. Однако образцы, загрязненные большим количеством органических веществ, рекомендуется обрабатывать минеральными кислотами.

При изучении бентосных водорослей, имеющих мощные панцири, прокалывание проводят в электропечи при температуре 450°C.

Покровные и предметные стекла считаются чистыми, если капля воды растекается по их поверхности. Новые стекла рекомендуется кипятить в 1%-ном растворе соды, затем их промывают дистиллированной водой, слабым раствором соляной кислоты и снова дистиллированной водой. Стекла, бывшие в употреблении, кипятят в мыльной воде и затем в течение суток выдерживают в хромовой смеси. От бихромата стекла отмывают дистиллированной водой. Чистые стекла хранят в 96%-ном этиловом спирте.

При обработке кислотами пробы предварительно очищают от грубых органических и минеральных примесей на часовых стеклах, отмывают от формалина и солей дистиллированной водой путем отстаивания или центрифугирования.

Полученный осадок на несколько суток заливают концентрированной серной кислотой, затем добавляют несколько кристалликов бихромата калия и несколько раз промывают дистиллированной водой с последующим центрифугированием до полного отмывания от кислоты.

Полученный после прокалывания или обработки кислотами материал консервируют 2-3%-м раствором формальдегида для последующего хранения или приготовления постоянных препаратов.

С этой целью на тонкие, чистые и обезжиренные покровные стекла наносят суспензию диатомовых водорослей и высушивают. На предметное стекло помещают небольшое количество синтетической смолы (плевракс, гиракс и др.) с показателем преломления выше 1,6. Затем смолу растапливают над пламенем горелки и

накрывают покровным стеклом с исследуемым материалом, осторожно надавливая на него и разравнивая среду тонким равномерным слоем. Излишки смолы снимают с помощью ксилола.

Диатомовые, имеющие очень тонкие и нежные панцири, изучают на сухих препаратах с воздушной средой. Для их изготовления суспензию диатомовых водорослей наносят на покровное стекло, высушивают, помещают на предметное стекло и заклеивают по краям лаком.

Для декальцинирования водорослей, инкрустированных известью (например, харовые) или водоросли, живущие в известковых породах (сверлящие водоросли), применяют молочную кислоту, способствующую также просветлению препарата, а при ее отсутствии используют соляную кислоту.

МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО УЧЕТА ВОДОРОСЛЕЙ

Микроскопирование проб водорослей

Количественному учету подвергаются только количественные пробы фитопланктона, фитобентоса и перифитона.

Данные о численности водорослей являются исходным материалом для вычисления их биомассы и для пересчета других количественных показателей (содержание пигментов, белков, интенсивности дыхания, фотосинтеза и др.) на одну клетку или единицу биомассы. Счетный метод наиболее старый и самый трудоемкий, однако при биологическом анализе он всегда будет сохранять свою ценность.

Подсчет численности водорослей осуществляется в специальных счетных камерах определенного объема: Нажотта ($0,01 \text{ см}^3$), Учинская ($0,02 \text{ см}^3$), Горяева (1 мм^3), Фукса-Розенталя и др. Наиболее предпочтительной являются камеры типа Учинская или Нажотта с площадью дна 1 см^2 и высотой 100, 200 мкм, хотя вполне удовлетворительные результаты можно получить и в камере Горяева, применяемой в медицине. Дно первых двух камер разделено продольными линиями на 40 полос при ширине каждой 250 мкм и длине 10 мм.

При рутинных исследованиях рекомендуется использование счетных камер объемом 0,01 и 0,02 мл. Камеры большего объема (0,05 мл) можно использовать при

работе с крупными и колониальными видами водорослей. «Мелкая» камера (в частности, Горяева) может быть рекомендована для анализа планктона, не содержащего крупных форм (Федоров, 1979).

При гидробиологических исследованиях необходимо получить статистически достоверные и сравнимые по численности и биомассе результаты.

Перед счетом проба тщательно перемешивается продуванием воздухом через чистую трубочку с входным отверстием не менее 2 мм, и затем одна капля пробы этой же трубочкой вносится в счетную камеру.

Камера закрывается покровным стеклом, и после оседания водорослей (10-15 мин) проводится просмотр пробы и определение видового состава всех встреченных водорослей. Подавляющее большинство водорослей хорошо определяется в фиксированном состоянии.

Один их наиболее существенных аспектов счетного метода – статистическая достоверность подсчета. Поскольку всю пробу подсчитать невозможно, то возникает вопрос, какую ее часть необходимо обработать, чтобы иметь правильное суждение о пробе в целом.

В целом, численность пресноводного планктона довольно высока, и при концентрировании пробы в 100-200 раз (0,5-1 л до 5 мл) в счетной камере объемом 10 мм³ может находиться от пяти до нескольких десятков тысяч клеток. Детальные исследования (Кольцова и др., 1971; Федоров, 1979) показали, что объем минимальной выборки определяется необходимостью тотального просчета не менее 3000 особей независимо от исходной плотности фитопланктона в отобранной пробе. При просмотре около 3000 особей число преобладающих видов водорослей обычно колеблется в пределах 15-30 (для пресноводного фитопланктона) и 25-50 (для морского).

Даже при самом тщательном заполнении камеры площадью дна 1 см² организмы в ней распределяются неравномерно. Поэтому необходимо просчитывать каждую пятую полосу камеры, а при высокой численности – каждую десятую (в камерах Нажотта, Учинская). Водоросли в камере Горяева просчитываются полностью.

Специалисты рекомендуют проводить повторные просчеты нескольких (не менее 3-5) камер из одной и той же пробы. Каждый раз, отбирая пипеткой образец для просчета, необходимо тщательно взбалтывать пробу, продувая ее воздухом.

Крупные формы планктона (*Microcystis*, *Gloetrichia*, *Volvox*, *Ceratium* и др.) просчитывают в камерах большого объема (не менее 0,1 см³).

Сконцентрированный фитопланктон содержит мелкие и крупные водоросли, находящиеся в разных количественных соотношениях, поэтому специалисты рекомендуют (Федоров, 1979) несколько правил, соблюдение которых существенно облегчает анализ выборки и повышает качество обрабатываемого материала.

1. Каждую выборку следует просматривать при двух различных увеличениях – большом и малом – для отдельного учета крупных и мелких форм фитопланктона.
2. При учете численности каждой популяции в зависимости от ее численности можно в пределах одной выборки анализировать различное число подпроб (полос). В одном случае рекомендуют сократить число анализируемых полос в пределах каждой камеры, оставив неизменным число анализируемых камер (не менее 5 камер при просчете 3000 клеток). Поэтому для наиболее обильных по численности видов рекомендуется вести учет в половине или даже четверти объема каждой камеры, изменяя тем самым по отношению к ним объем репрезентативной выборки.
3. Исследуя содержимое полос, просчет особей в счетной камере следует вести челноком.

При изучении фитопланктона необходимо все встреченные в камере водоросли тщательно замерять, отмечать их жизненное состояние и стадию развития. Можно вывести средние размеры клеток, однако обязательно это надо делать при работе с исследованным материалом, причем для каждого сезона и года необходимы новые измерения. Ни в коем случае нельзя пользоваться средними размерами, полученными на других водоемах, т.к., такая нивелировка сводит на нет всю предыдущую попытку исследователя получить репрезентативный материал.

При исследовании количественных проб фитопланктона просчет численности организмов на 1 л воды проводят по следующей формуле:

$$N = K \cdot n (A / a) v (1000 / V),$$

где: N – количество организмов в 1 л воды исследуемого водоема;

K – коэффициент, показывающий во сколько раз объем счетной камеры меньше 1 см³;

n – количество организмов, обнаруженных на просмотренных дорожках (квадратах, полосах) счетной камеры;

A – количество дорожек (квадратов, полос) в счетной камере;

a – количество дорожек (квадратов, полос), на которых производился подсчет водорослей;

V – первоначальный объем отобранной пробы (см³);

v – объем сгущенной пробы (см³).

При изучении количественных проб фитобентоса и перифитона, в которых обычно преобладают сравнительно крупные водоросли, пользуются преимущественно штемпель-пипеткой объемом 0,1 см³.

Расчет численности водорослей в пробах бентоса и перифитона ведут на 10 см² поверхности субстрата по формуле:

$$N = (n \cdot 10 \cdot v / S) \cdot 10,$$

где: N – количество водорослей на 10 см² поверхности субстрата;

n – число водорослей в просчитанной капле воды объемом 0,1 см³;

v – объем пробы (см³);

S – площадь сечения трубки в микробентометре (для бентосных проб) или площадь поверхности субстрата, с которого смыты водоросли (см²) (для проб обрастаний).

При изучении эпифитных водорослей их численность, кроме того, рассчитывают на 1 г сырой (или сухой) массы растения-субстрата по следующей формуле:

$$N = n \cdot 10 \cdot v / P,$$

где: N – число водорослей на 1 г массы растения-субстрата;

n – число водорослей в просчитанной капле воды объемом 0,1 см³;

v – объем пробы (см³);

P – сырая (или сухая) масса (г) участка растения, с которого были смыты эпифиты.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОМАССЫ ФИТОПЛАНКТОНА

Наряду с количеством и численностью видов биомасса фитопланктона отнесена к важнейшим характеристикам структуры сообщества.

Биомасса выражается массой особой популяции или сообщества, отнесенной к единице площади (м^2 , га, км^2) или к единице объема (см^3 , л, м^3). Биомассу фитопланктона выражают в весовых единицах сырого, сухого, сухого обеззоленного вещества или органического углерода. Реже применяются и другие единицы измерения, такие, например, как калории, содержание азота, АТФ и др. (Федоров, 1979).

СОДЕРЖАНИЕ ВОДЫ И ЗОЛЫ В ВОДОРОСЛЯХ

Все живые организмы, в том числе и водоросли, состоят в основном из воды. Для определения ее содержания в водорослях (а, соответственно, и сухого вещества) используют лиофильную сушку в вакууме при низкой температуре. Сушка материала в печи для этих целей не подходит, т.к. при высокой температуре происходит потеря (до 20% и более) летучих органических веществ.

Исследования показали (Федоров и др., 1974), что фитопланктон содержит 75-95% (в среднем 82%) воды. Количество сухого вещества, соответственно, составляет 15-18%. Содержание золы в сухом веществе колеблется от 4 до 10% (у зеленых и синезеленых водорослей) до 50-70% у диатомовых. При этом даже у одного и того же вида содержание золы может сильно меняться в зависимости от условий среды. В среднем содержание золы в сухом веществе водорослей составляет 35% (Федоров и др., 1974).

Принимая, что природный фитопланктон содержит 82% воды и 35% золы (от сухого) и что содержание углерода в обеззоленном веществе водорослей в среднем равно 50% (обычно колеблется от 40 до 60%), находим, что сырая масса водорослей содержит 6% углерода. Это соотношение может быть использовано для перехода от величин сырой массы водорослей к содержанию в них углерода (Федоров, 1979).

Для морского планктона переход от численности водорослей к весовым характеристикам производится по формуле:

$$\text{мкгС/л} = 0,06 \sum n_i v_i,$$

для пресноводного планктона:

$$\text{мкгС/л} = 0,1 \sum n_i v_i,$$

где: v_i - средний объем клетки в мкм^3 i -того вида, n_i - его численность в одном литре.

Кроме того, биомассу фитопланктона выражают в единицах энергии – калориях. Средняя калорийность беззольного вещества сухой массы водорослей и макрофитов составляет 4,6-4,7 ккал/г, что позволяет принять допущение, что 1 г органического углерода биомассы эквивалентен 10 ккал.

СОДЕРЖАНИЕ АЗОТА И ФОСФОРА В ВОДРОСЛЯХ

Содержание азота в беззольном сухом веществе водорослей в среднем равно 8% (при варьировании от 5 до 12%). Минимальные значения в клетках водорослей наблюдаются при его недостатке в среде. Потребление азота (так же как и фосфора) на единицу биомассы водорослей возрастает с увеличением содержания этих элементов в окружающей среде (Федоров и др., 1974; Федоров, 1979).

Содержание фосфора в биомассе фитопланктона подвержено еще большим колебаниям, чем содержание азота. Это связано со способностью многих водорослей запасать «впрок» соединения фосфора. При его недостатке в среде этот запасенный фосфор используется водорослями процессе жизнедеятельности.

Поэтому биомассу водорослей не рекомендуется выражать в фосфорных единицах. То же самое относится и к азоту. Наиболее достоверным элементом для выражения биомассы водорослей является углерод; в связи с этим очень часто биомассу фитопланктона выражают в единицах органического углерода.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОМАССЫ ВОДРОСЛЕЙ ПО ИХ ЧИСЛЕННОСТИ

Наиболее распространенным является метод определения биомассы исходя из вычисления численности и объема клеток каждого вида водорослей, полученные после количественной обработки проб.

Определение объема отдельных клеток осуществляют следующим способом: форма клетки тех или иных водорослей приравнивается к наиболее близкому по форме геометрическому телу, затем измеряют параметры клеток, необходимые для вычисления объема этого геометрического подобия (см. приложение 3). Поскольку подавляющее большинство видов водорослей имеет форму шара, цилиндра, эллипсоида или двух конусов, то каждый исследователь может составить себе таблицу объемов этих тел и постоянно пользоваться ими. В случае более сложной формы клетки приходится вычислять объем индивидуально.

По результатам массовых измерений величин объемов вычисляют средний объем клетки данного вида. Принимая удельную массу водорослей равной единице, исходя из объема клетки, определяют ее массу. Перемножая численность клеток на их массу, получают биомассу популяции. Суммированием последних находят биомассу всего фитопланктонного сообщества. Биомасса выражается в миллиграммах на 1 литр (или $г/м^3$) с точностью до 0,1 мг/л или 0,01 $г/м^3$.

Необходимо иметь в виду, что размер клеток отдельных видов водорослей сильно варьирует в зависимости от условий среды, типа водоема, времени года. Поэтому при работе на конкретном водоеме необходимо измерять объемы клеток, по крайней мере, наиболее массовых форм несколько раз в год.

Если была обработана интегрированная проба для всей толщи воды, то полученная биомасса будет отражать среднюю величину для всей глубины. Перемножая ее на глубину станции ($м$) находят биомассу под 1 $м^2$ поверхности.

Если была отобрана серия проб по вертикали с промежутком в 1 $м$, то среднюю биомассу находят как среднюю арифметическую; если же промежутки были неодинаковы, то – как взвешенную среднюю арифметическую (Кузьмин, 1975):

$$M = (V_1P_1 + V_2P_2 + \dots + V_nP_n) / (P_1 + P_2 + \dots + P_n) = \Sigma VP / \Sigma P,$$

где: V_1, V_2, V_n - биомасса фитопланктона ($г/м^3$) с разных горизонтов;

P - $1/2$ промежутка ($м$) между отобранными пробами;

ΣVP - биомасса фитопланктона под $м^2$ поверхности ($г/м^2$).

M - взвешенная средняя арифметическая ($г/м^3$).

Анализ распределения фитопланктона по акватории водоема необходимо проводить по средневзвешенной биомассе (средней для всего столба воды), а

продуктивность – по биомассе под 1 м² поверхности.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОМАССЫ ВОДОРΟΣЛЕЙ ПО СОДЕРЖАНИЮ В НИХ ХЛОРОФИЛЛА

В современных гидробиологических исследованиях содержание хлорофилла используется для оценки биомассы фитопланктона. Изучение содержания хлорофилла в единице биомассы фитопланктона пресноводных водоемов показало высокую корреляцию между этими величинами. При этом отмечается высокая вариабильность отношения хлорофилла к биомассе, обусловленная сезонным состоянием фитопланктона, трофностью водоема, гидрологическими и метеорологическими факторами. Тем не менее, установление корреляции между хлорофиллом и биомассой фитопланктона на определенном водоеме позволяет следить за изменениями биомассы фитопланктона по количеству хлорофилла (Руководство по гидробиологическому мониторингу ..., 1992).

Другим важным фактором является то, что различные таксономические группы фитопланктона имеют разный набор пигментов, в частности, хлорофиллов а, в и с. Например, хлорофилл а (а также и другие пигменты) найдены у всех групп водорослей. Хлорофилл в указывает на присутствие зеленых и синезеленых водорослей. Хлорофилл с встречается у диатомовых, динофитовых, золотистых и криптофитовых водорослей. Поэтому сведения об этих пигментах позволяют оценить соотношение таксономических групп водорослей в фитопланктонном сообществе. Другой важной характеристикой состояния фитопланктона является количество феофитина – продукта распада хлорофилла. Увеличение феофитина указывает на затухание фотосинтетической активности фитопланктона и угнетение в развитии водорослей.

Наиболее полные сводки рекомендаций по определению хлорофилла в водорослях содержатся в ряде руководств (Strickland, Parsons, 1969; ed Vollenweider, 1969). Суть данного метода заключается в сборе и концентрировании фитопланктона на мембранных фильтрах, затем хлорофиллы экстрагируют раствором ацетона или метанола и спектрофотометрируют при определенных длинах волн.

Ниже приводится описание основных приемов определения хлорофилла в пробах фитопланктона.

Для достоверного определения содержания хлорофилла необходимо получить достаточно большую концентрацию растительных клеток. Поэтому пробы отбирают в относительно больших объемах: около 0,5 л для эвтрофных водоемов; не менее 1 л для мезотрофных водоемов; 3-5 л – для олиготрофных. Объем отбираемой пробы может варьировать в зависимости от количества фитопланктона на данном участке в конкретный период времени. Однако количество хлорофилла а в пробе должно быть не менее 1 - 20 мкг.

Затем воду фильтруют через мембранные фильтры диаметром от 30 до 60 мм (размер пор около 0,65 мкм). Использование мембранных фильтров диаметром 60-100 мм позволяет ускорить процесс фильтрации. Для этих целей лучше всего подходят ядерные фильтры, изготавливаемые в Объединенном институте ядерных исследований РАН (г.Дубна). Перед фильтрованием, для предотвращения разрушения пигментов, фильтр покрывают слоем $MgCO_3$ из расчета 10 мг на 1 cm^2 фильтрующей поверхности. Чтобы уменьшить возможность разрушения фитопланктона, фильтрацию следует проводить при небольшом разрежении, в пределах 0,4-0,6 атм (примерно 400-600 гПа). Для фильтрации следует использовать воронки из плексигласа.

После окончания фильтрации рекомендуется сразу же провести экстрагирование содержимого фильтра без его подсушивания, чтобы свести к минимуму потери от разрушения пигментов. Для длительного хранения фильтры необходимо высушить в эксикаторе с силикагелем, щелочью и натронной известью (соотношение 1 : 1 : 1).

Хранение высушенных фильтров попускается от нескольких дней до 1-го месяца (не более 2-х месяцев) в присутствии силикагеля в темноте при температуре не выше 1°C. Однако необходимо иметь в виду, что потери пигментов при этом могут достигать 10-15% и более.

В качестве растворителя используется 90-%-ный раствор ацетона (на дистиллированной воде) или метанол. Экстракция пигментов ацетоном менее эффективна для некоторых водорослей, чем экстракция метанолом. Однако

спектральные характеристики пигментов в ацетоне изучены значительно лучше, чем в метаноле. Поэтому можно использовать любой из этих растворителей.

При экстракции ацетоном фильтр с водорослями и $MgCO_3$ заливают 2-3 мл 90%-ного раствора ацетона и растирают в гомогенизаторе в течение 1-2 мин. Полученную смесь переносят в центрифужную пробирку, добавляют 90%-ного ацетона до объема 10 мл и выдерживают в темноте при комнатной температуре в течение 10 мин. Центрифугирование экстракта проводят в течение 10 минут при 4000-5000 об/мин. После центрифугирования экстракт сливают в мерную пробирку, а в центрифужную добавляют 5 мл 90%-ного ацетона и еще раз проводят экстракцию и центрифугирование. Полученный экстракт также сливают в мерную пробирку, закрывают притертой пробкой и регистрируют объем полученного экстракта.

Подготовленный к спектрофотометрированию экстракт следует хранить в холодильнике не более 1 суток. Но лучше провести спектрофотометрирование сразу же после экстрагирования.

При экстракции метанолом фильтр с водорослями гомогенизируют, затем смесь доводят до объема 10 мл кипящим раствором метанола, после чего экстракт сразу же центрифугируют (при тех же условиях).

В зависимости от плотности экстракта при спектрофотометрии используют кюветы от 1 до 5 см. Из мерной пробирки часть экстракта с помощью пипетки переносят в кюветы спектрофотометра. В кюветы сравнения наливают 90%-ный раствор ацетона и измеряют оптические плотности экстракта D на длинах волн 430, 630, 645, 663, 750 нм. После этого подкисляют экстракт в кювете 2-3 каплями 0,5%-ной HCl и снова измеряют оптические плотности на длинах волн 750 и 663 нм, что необходимо для последующего расчета содержания феофитина.

В разных методических руководствах иногда приводятся иные длины волн, однако различия в области максимумов незначительны и не играют существенной роли на получение окончательных результатов.

Концентрацию пигментов рассчитывают следующим образом (Руководство по гидробиологическому мониторингу ..., 1992).

1. В значения оптической плотности D_{663} , D_{645} и D_{630} вводят поправку на мутность экстракта D_{730} , на длину кюветы l (см), на объем экстракта $V_э$ (мл), на

объем профильтрованной пробы V_{II} (л) и получают значения истинной оптической плотности E . Формулы получения E аналогичны для всех трех значений D . Например, для D_{663} формула имеет следующий вид:

$$E_{663} = (D_{663} - D_{730}) V_{э} / V_{II} ,$$

2. Определяют истинную оптическую плотность экстракта после подкисления:

$$E_{663(к)} = (D_{663(к)} - D_{730(к)}) / l .$$

Концентрацию (Схл, мкг/л) хлорофиллов a , b и c вычисляют на основе истинных оптических плотностей по формулам, рекомендованным рабочей группой ЮНЕСКО (Руководство по гидробиологическому мониторингу ..., 1992):

$$\text{Схл. } a = 11,64 E_{663} - 2,16 E_{645} + 0,10 E_{630};$$

$$\text{Схл. } b = 20,97 E_{645} - 3,94 E_{663} - 3,66 E_{630};$$

$$\text{Схл. } c = 54,22 E_{630} - 5,53 E_{663} - 14,81 E_{645};$$

Содержание феофитина (%) рассчитывают по формуле:

$$\text{Сф} = (1,7 E_{663(к)} - E_{663}) 100 / 0,7 E_{663}$$

По данным о концентрации хлорофилла a можно рассчитать величину биомассы фитопланктона. Хлорофилл a составляет примерно 2,5% от веса сухой массы, т.е., 3,4% от обеззоленной сухой биомассы, или 6,75% от содержания органического углерода (Винберг, 1960). Таким образом, при переходе от концентрации хлорофилла a к биомассе, выраженной в единицах углерода, допустимо использовать пересчетный коэффициент 15, т.е., **$Bc = 15 \text{ Chl } a$** .

При определении биомассы и продукции водорослей хлорофильным методом большое значение имеет степень извлечения (экстракция) пигментов из клеток водорослей. Многие из них имеют плотные оболочки, которые с трудом поддаются разрушению.

Ввиду небольших размеров клеток и наличия у многих из них плотной оболочки (например, у синезеленых, некоторых протококковых водорослей), поэтому предварительное разрушение клеток требует применения ряда специальных приемов. С этой целью используют механическое разрушение клеток с наполнителем (кварцевый песок, стеклянный порошок и др.), ультразвуковые дезинтеграторы, ряд ферментов (например, лизоцим, мурамидазу) и др.

Ниже приводятся несколько методик разрушения клеток водорослей и экстракции пигментов.

Хорошие результаты дает применение порошка из синтетических алмазов – АСМ 40/28 с размерами зерен основной фракции 28-40 мкм (Меницкая, 1970). Его зернистость соизмерима с величиной клеток водорослей, не засоряет поры стеклянных фильтров Шотта, которые используются для разделения взвеси и хлорофилла. Использованный алмазный порошок поддается регенерации (после озоления органического вещества и последующего промывания).

Навеску водорослей переносят в фарфоровую ступку, добавляют 50-100 мг алмазного порошка (при анализе пигментов достаточно взять порошка в однократном соотношении к весу навески), немного мела, несколько капель растворителя (ацетон, метанол).

Процесс растирания занимает в среднем в 3 раза меньше времени, по сравнению с применением стеклянного порошка. Особенно удобны алмазные порошки для работ, где требуется быстрое и максимально полное разрушение клеток и экстрагирование пигментов без использования дополнительных факторов (нагрева, замораживания и др.).

Экстракция пигментов из водорослей, имеющих слизистый слой, крайне затруднена; слизь не позволяет растворителю проникать в клетку. Для лучшей экстракции необходимо разрушить оболочку. Это достигается различными приемами (Бажанова и др., 1964).

Клетки, отцентрифугированные от среды при 1000 об./мин в течение 5 мин, суспензируют в небольшом количестве метанола или ацетона. Полученную суспензию растирают в фарфоровой ступке со стеклянным порошком или другими веществами (тальк, абразив, алюмогель, безводный серноокислый натрий). Порошковидное вещество берут в 10-кратном по объему количестве по отношению к объему суспензии. Очень часто используют безводный серноокислый натрий, который обезвоживает ткани, сохраняя пигменты.

Водоросли растирают в течение 3-6 мин до полного испарения метанола. Полученный порошок наносят на стеклянный фильтр (№ 3 и № 4) и заливают небольшой порцией растворителя. После 3-4-кратной экстракции порошок с

водорослями становится совершенно бесцветным.

Полнота экстракции пигмента зависит не только от степени разрушения клеточной оболочки, но и от характера растворителя. Наиболее часто применяют полярные растворители – ацетон и этанол. Каротин из растительных клеток извлекают гексаном, петролейным эфиром или бензином.

Для извлечения пигментов из высушенного материала необходимо предварительно экстрагировать его 45-50%-ным водным раствором ацетона. Такой раствор ацетона удаляет большое количество водорастворимых примесей, что облегчает дальнейшее извлечение пигментов чистым ацетоном.

Извлечение пигментов зеленых нитчатых водорослей (обработателей) (Сапожников, 1964). Из предварительно измельченных на стекле биомассы водорослей берут навеску 0,5 – 1 г, помещают ее в фарфоровую ступку, добавляют 0,5 – 1 г абразива или стеклянного порошка, 10-15 г мела или соды, несколько капель растворителя и растирают в течение 5-10 минут. К растертой массе добавляют 2-3 мл растворителя и отфильтровывают через стеклянный фильтр Шотта № 4 с помощью колбы Бунзена и вакуумного насоса. К оставшейся массе снова добавляют 2-3 мл растворителя и повторяют процесс фильтрации. Экстракцию осуществляют 3-5 раз, пока в приемную посуду не начнут стекать бесцветные капли фильтрата. Объем вытяжки пигментов доводят до 10-20 мл. В полученном экстракте определяют либо суммарное количество пигментов, либо содержание каждого пигмента отдельно.

Для расчета содержания пигментов на сухое вещество из исследованной массы берут параллельные навески 0,5-1 г в бюксы, и, после высушивания до постоянного веса при температуре 105°C, определяют содержание сухого вещества. У нитчатых зеленых водорослей (таких как, спиригира, кладофора, эдогониум) содержание сухого вещества находится в пределах 20%.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ВОДРОСЛЕЙ

При работе с водорослями важное значение имеет не только определение темпов их роста и размножения, но и умение диагностировать состояние и степень

жизнеспособности. Одним из важнейших элементов этой диагностики может быть определение соотношения живых и мертвых клеток, как в природной среде, так и в условиях культур, поскольку всегда имеется определенное количество ослабленных и мертвых водорослей.

Численность последних резко увеличивается при попадании водорослей в экстремальные условия, когда организм находится под влиянием какого-либо угнетающего фактора (температуры, режима освещения, pH, условий питания, альгицидов и др.). В этом случае дифференциация клеток на живые и мертвые является показателем эффективности агента, ингибирующего жизнедеятельность водорослей.

Для определения соотношения живых и мертвых клеток водорослей используют различные методы: плазмолитический, люминесцентной микроскопии, дифференциального окрашивания и др.

Наиболее широко используется метод дифференциального окрашивания, основанный на различной проницаемости и адсорбции красителя живой и мертвой клеткой.

Определение живых и мертвых клеток водорослей методом комбинированного плазмолиза (Методика биологических исследований ..., 1971).

Определение соотношения живых и мертвых клеток водорослей основано на применении комбинированного плазмолиза (в растворе красителя). Исследуемый объект (суспензия клеток, дерновинки нитчаток) обрабатывают 5-7%-ным раствором NaCl, подкрашенным нейтральротом или метиленовой синью. Для синезеленых водорослей наилучший результат дает нейтральрот (1:10000), а для диатомовых – метиленовая синь (1:10000). Краситель дает возможность более четко наблюдать этап возникновения плазмолиза в солевом растворе. Живые клетки дают плазмолиз, а мертвые – не дают. Просчитав соотношение живых и мертвых клеток в 10-20 полях зрения, можно вывести средний процент.

Для анализа соотношения живых и мертвых водорослей в одном препарате просчитывают не более 2-х полей зрения. Затем готовят следующий препарат и т.д. Это связано с необходимостью уменьшения времени вредного действия химических реактивов на живую протоплазму.

Определение живых и мертвых клеток синезеленых и зеленых водорослей с помощью красителей (Методика биологических исследований ..., 1971).

Для определения живых и мертвых клеток зеленых водорослей (хлорелла, спенедесмус и др.) используют следующие красители: метиленовую синь и нейтральный красный. К 1 мл суспензии водорослей добавляют 1 мл метиленовой сини и нейтрального красного в разведении 1:5000. Растворы красителей и водорослей перемешивают и через 20 минут микроскопируют. Метиленовая синь окрашивает мертвые клетки в синий цвет. Живые клетки окрашиваются нейтральным красным в розовый цвет.

Для определения живых и мертвых клеток синезеленых водорослей (анацистис, анабена и др.) используют красители трифенилтетразолийхлорид (ТТХ) и азур-эозин. К 1 мл суспензии водорослей добавляют столько капель 0,2%-ного раствора ТТХ, чтобы его конечная концентрация в среде составляла 0,075%, и 1-2 капли 0,1%-ного раствора азур-эозина.

Пробы перемешивают и помещают на 16-20 ч на рассеянный свет, затем микроскопируют. ТТХ окрашивает живые клетки в ярко-красный цвет, а азур-эозин - мертвые клетки - в фиолетовый цвет. Это происходит в результате восстановления ТТХ в живых клетках с образованием формазана.

Под микроскопом подсчитывают число клеток с различной окраской. Подсчет проводят в нескольких параллельных препаратах (не менее 3-х).

Экспресс-метод определения соотношения живых и мертвых клеток водорослей (Методы физиолого-биохимического исследования водорослей ..., 1975). Определение соотношения живых и мертвых водорослей основано на применении растворов эритрозина и эозина. Эти красители по отношению к различным видам водорослей не универсальны.

Смешивают равные объемы суспензии водорослей и красителей. Раствор последнего необходимо брать в такой концентрации, чтобы после смешивания с объемом суспензии составляла 0,25-0,3%. Через 15-20 мин окрашенные препараты просматривают под микроскопом при масляной иммерсии. Краситель окрашивает мертвые клетки в розово-желтый или бледно-розовый цвет в зависимости от вида водорослей, не изменяя окраски живых.

Подсчет числа окрашенных и неокрашенных клеток в поле зрения микроскопа позволяет определить соотношение (в %) живых и мертвых клеток в исследуемом образце.

Определение живых и мертвых клеток синезеленых водорослей цитохимическими методами (Осетров, 1968). Эти методы определения активности клеток основаны на использовании ряда цитохимических реакций.

Окраска нейтральным красным и азуром. Каплю исследуемых водорослей обрабатывают на предметном стекле смесью нейтраль-рота (0,5%) и 1%-ного азура 1 в растворе Рингера (NaCl – 6-7 г/л; KCl – 0,075 г/л; CaCl₂ – 0,1-0,25 г/л; NaHCO₃ – 0,1-0,2 г/л). Препарат покрывают покровным стеклом и выдерживают в течение 1 часа при температуре 30⁰С. У живых клеток образуются красные гранулы нейтраль-рота. Мертвые клетки окрашиваются азуром 1 в голубой цвет.

Окраска нигрозином. Каплю суспензии водорослей обрабатывают на предметном стекле 2%-ным раствором нигрозина на двойном растворе Рингера. Препарат покрывают покровным стеклом и выдерживают во влажной камере в течение 1 ч при 25⁰С. Мертвые клетки окрашиваются в черный цвет.

Определение аскорбиновой кислоты. Этот метод можно отнести к числу наиболее чувствительных тестов жизненной активности. Препарат водорослей обрабатывают 10%-ным раствором AgNO₃ в 3%-ной уксусной кислоте в течение 14 ч (в темноте). После инкубации препарат промывают 95%-ным спиртом и обезвоживают абсолютным спиртом. Поскольку только живые клетки синтезируют аскорбиновую кислоту, то в них происходит восстановление AgNO₃. В результате - живые клетки обесцвечиваются, а мертвые окрашиваются в серо-темные тона.

Цитохимическая реакция на обнаружение аскорбатоксидазы в живых водорослях. Каплю суспензии водорослей инкубируют на предметном стекле с каплей свежей 10%-ной аскорбиновой кислоты в течение нескольких часов. После этого инкубационную жидкость отсасывают, а препарат промывают водой (избыток воды удаляют). Далее проводят реакцию на аскорбиновую кислоту.

Интенсивность серой окраски обратно пропорциональна активности фермента. Она проявляется только у живых клеток водорослей.

Цитохимическая реакция на обнаружение фермента цитохромоксидазы в живых водорослях. Каплю суспензии водорослей инкубируют на предметном стекле в течение 5 мин с каплей свежей смеси (2%-ный диэтил – или метилпарафенилендиаминхлорид + 1%-ный нафтол в 50%-ном спирте + 1,7%-ный раствор NaHCO_3 в соотношении 1:1:1). Если фермент активен (т.е., если водоросли живые), образуется синяя окраска внутри клетки. Реакцию дают только живые водоросли.

Дифференциация живых и мертвых водорослей при использовании люминесцентной микроскопии (Горюнова, 1956). Этот метод основан на том, что при микроскопировании водорослей в ультрафиолетовых лучах клетки, различающиеся по физиологическому состоянию, дают различные по окраске и яркости оттенки свечения.

Важное значение имеет техника приготовления препарата. Для плотных суспензий водорослей (а также для “дерновинок” нитчаток) микроскопируют каплю исследуемого образца. Ее наносят на предметное стекло, прикрывают покровным стеклом и микроскопируют. Аналогично готовят препарат из нитчатых водорослей.

Низкие концентрации водорослей предварительно сгущают (центрифугированием или фильтрацией пробы через мембранный фильтр). Фильтр с водорослями помещают на предметное стекло, слегка смачивают водой; если он подсох, накрывают покровным стеклом и микроскопируют. Для просветления препарата поверх покровного стекла наносят каплю анизол, что способствует более четкой видимости объекта.

Фильтры в ультрафиолетовых лучах светятся желто-зеленым светом (фон). Однако это не мешает микроскопированию клеток – они четко различаются на фоне фильтра.

Живые клетки водорослей имеют ярко-красную флуоресценцию. Иной тип свечения характерен для отмирающих и мертвых клеток. Особенно разнообразная гамма световых переходов у отмирающих водорослей. Изменение спектра свечения клеток водорослей от живых к мертвым проходит по следующим фазам: 1) ярко-красное; 2) тускло-бордовое или розово-красное; 3) оранжево-розовое; 4) голубовато-зеленое; 5) оливково-зеленое. Последние оттенки световой гаммы характерны для

мертвых клеток и детрита. Промежуточные оттенки свечения характерны для различных степеней отмирания клеток.

При микроскопировании препарата подсчитывают количество клеток водорослей с различными оттенками свечения и затем рассчитывают соотношение клеток различного физиологического состояния в исследуемом образце.

Определение живых и мертвых клеток водорослей иловых отложений (Методы физиолого-биохимического исследования водорослей ..., 1975).
Определение ведется с использованием люминесцентного микроскопа.

Поверхностную часть донного образца из границы раздела ил-вода аккуратно наносят тонким слоем (до 0,5 мм) на предметное стекло. Иловым мазком покрывают примерно 2/3 поверхности стекла. При нанесении иловых отложений на стекло необходимо стремиться к максимальной выровненности поверхности.

Стекло с иловым мазком помещают на предметный столик микроскопа и рассматривают в падающем ультрафиолетовом свете (освещение сверху через ипак-иллюминатор). На темной поверхности мазка ярко флуоресцируют клетки водорослей и частицы детрита.

При количественных подсчетах соотношения живых, мертвых и отмирающих клеток и колоний водорослей готовят серию иловых мазков (4-10), в каждом из которых подсчитывают 10 полей зрения по длине илового мазка. При подсчете учитывают три категории свечения: яркие пурпурно-красные клетки с высокой жизненной активностью, клетки с тускло-красным и оранжево-красным свечением – отмирающие, салатно-зеленые – мертвые клетки. На основании проведенного подсчета определяют процентное соотношение различных категорий клеток водорослей в зависимости от их физиологического состояния.

При микроскопировании необходимо следить за тем, чтобы они не подсыхали. Если это происходит, поверхность препарата увлажняют каплей воды. При работе на больших увеличениях (в 40, 90 раз) мазок следует прикрыть покровным стеклом. На малых увеличениях (в 10, 20 раз) это делать необязательно. Выдерживать препараты под микроскопом более 15-20 минут нежелательно, т.к. это приводит к их перегреванию и выцветанию окраски.

ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВОДОРΟΣЛЕЙ

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР ВОДОРΟΣЛЕЙ

Метод культур широко используется в практике гидробиологических исследований, особенно при проведении физиологических и токсикологических работ. Источником чистых культур служат собранные в водоеме живые водоросли. Сбор образцов для последующего выделения из них культур водорослей проводят в период активной вегетации фитопланктона. Образцы отбирают в том месте, где интересующий вид представлен в максимальной численности и состоянии высокой жизненной активности. Пробы следует отбирать там, где меньше всего сказывается влияние берега. Кроме того, не рекомендуется отбирать пробы в местах нагона планктона, поскольку там присутствуют отмершие водоросли и развивается большое количество бактерий.

Сосуд с образцами водорослей выдерживают при рассеянном освещении и температуре не выше 20⁰С. При длительном хранении (до 2-3 недель) образцы воды можно некоторое время (до 5-10 дней) сохранять в холодильнике (при 2-5⁰С). Однако необходимо помнить, что для успешного выделения водорослей из собранного материала его желательно сразу же использовать, не допуская длительного хранения.

Колбу с исходным материалом помещают в затененное место (на окно, выходящее на северную сторону) и периодически добавляют (по мере подсыхания) в нее воду из водоема или подходящую питательную среду. Такие смешанные культуры при надлежащем уходе сохраняются достаточно долго и могут служить источником живого материала в качестве контроля при изучении фиксированных проб. Поскольку в таких пробах присутствует большое число видов, то в них происходит вытеснение одних видов другими; биоценоз беднеет и постепенно сходит на нет.

Для получения чистых культур водорослей предварительно получают накопительные культуры. Наиболее простой путь их получения – посев собранного материала в сосуды с жидкой питательной средой. Для приготовления сред используют кипяченую (стерильную) воду из водоема. Для первых посевов воду желательно иметь из того же водоема, откуда отобран образец; среду разводят

стерильной водой в соотношении 1:5, 1:1 (Сиренко, 1968).

Сосуды, заполненные средой на 1/3-1/4 объема и засеянные водорослями, помещают на свет – 2000-5000 лк (для протококковых – 6000-10000 лк). Прямого солнечного света лучше избегать.

Для интенсификации развития тех или иных водорослей подбирают для них соответствующие питательные среды, оптимальные температурные и световые условия, степень аэрации и др. Составы питательных сред, наиболее широко применяемых для выращивания водорослей, даны в приложении 1.

В развитии водорослей проявляется сезонность. В связи с этим наиболее благоприятным временем для получения накопительных культур и выделения из них интересных видов является апрель-август. Осенью и зимой (исключение составляют виды, активно вегетирующие в природе в этот период) процесс получения культуры осложняется. Споры, собранные в природе, можно проращивать и зимой.

В условиях смешанных культур хорошо развиваются: из синезеленых – осцилляториевые, из зеленых – хлорококковые (*Scenedesmus*, *Chlorella*) и нитчатые (*Cladophora*, *Oedogonium*, *Stigeoclonium*). В смешанной культуре длительное время могут сохраняться эвглены.

Из накопительной культуры, представляющей в большинстве случаев смесь организмов, выделяют монокультуру (Гусева, 1956; Киселев, 1956).

Для получения альгологически чистых культур из накопительной используются обычные микробиологические методы и приемы – разведения, пересев, выделение клеток с помощью микроманипуляторов и др.

Для выделения монадных форм обычно используют их положительный фототаксис, благодаря которому подвижные клетки скапливаются на освещенной стороне сосуда (или капли), откуда их собирают с помощью пипетки. Этим способом из культуры выделяют как сравнительно крупные водоросли (*Volvox*, *Pandorina*, *Eudorina*), так и мелкие формы (*Chlamydomonas*).

Нейстонные водоросли, а также синезеленые (имеющие газовые вакуоли), отделяют от других водорослей центрифугированием, в результате которого они скапливаются в верхних слоях жидкости.

Чистую культуру некоторых видов водорослей получают с помощью покоящихся клеток (зигот, акинет, спор, цист), подвергая исходный материал воздействию экстремальных факторов (высушивание, замораживание, нагревание в термостате), разрушающих организмы, которые не образуют покоящиеся стадии. Для получения чистых культур ряда водорослей (*Oedogonium*, *Stigeoclonium*, *Ulothrix*, *Draparnaldia*) используют их способность образовывать зооспоры при неблагоприятных условиях среды; водоросли для этого помещают в атмосферу с содержанием 5% CO₂ (в вакуум-эксикаторе) (Успенская, 1966).

Для выделения отдельных организмов широко используется так называемый пипеточный метод, позволяющий отлавливать единичные клетки и колонии с помощью стерильной пипетки Пастера с тонко оттянутым длинным концом. Отлов водорослей осуществляется под биноклем или при малых увеличениях микроскопа.

Отловленные водоросли последовательно переносят из одной капли стерильного питательного раствора в другую, пока в капле не останется искомая водоросль без посторонних примесей. После этого ее переносят в пробирку со стерильной питательной средой и выставляют на рассеянный свет (искусственный или естественный).

Более удобным является метод агаровых пластинок. Для этой цели используют агаризованные питательные среды, содержащие от 0,5 до 2 % агар-агара. Среда с концентрацией агар-агара менее 0,5% используют для изоляции нежных жгутиковых организмов, не имеющих плотных клеточных покровов.

На поверхность агаровой пластинки в чашке Петри (диаметр 9 см) равномерно наносят 0,1 мл суспензии водорослей со средней плотностью 1 клетка в 1 мл среды. Чашки помещают на одни сутки на рассеянный свет для роста водорослей, а затем переносят в осветительную установку с люминесцентными лампами (освещенность около 2000 люкс).

Затем отдельные колонии, выросшие на поверхности агаровой пластинки, снимают вместе с кусочками агаровой среды стерильными инструментами (пипеткой, препаровальной иглой, ланцетом) и переносят в пробирку с жидкой питательной средой.

Двухкратное повторение этой процедуры позволяет не только избавиться от посторонних видов водорослей, но и получить клоновые культуры (Квитко, 1961). При многократных (до 10-20 раз) пересевах и при использовании для посева на чашку достаточно разведенных суспензий можно считать, что каждая колония выросла из отдельной клетки.

Длительность выращивания культуры водорослей без пересева на жидкой среде зависит от различных факторов: темпа роста водорослей, запаса питательных элементов в среде, целей и задач опыта.

Синезеленые водоросли можно длительное время (1-1,5 года) хранить без пересева, зеленые – до 1-2 месяцев, диатомовые – до 1 месяца. Указанные сроки ориентировочны и определяются указанными выше факторами (Сиренко и др., 1975).

Получение бактериально чистых (аксеничных) культур осуществляется с помощью антибиотиков, ультрафиолетового облучения или путем многократной проводки через стерильные агаризованные питательные среды с органическими веществами, способствующими выявлению бактериального загрязнения (Клейн, Клейн, 1974; Сиренко и др., 1975).

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Среды, используемые для искусственного разведения водорослей, чрезвычайно разнообразны. Выбор среды зависит от специфики культивируемого объекта и целей выращивания. Среды бывают жидкие и твердые (агаризованные).

Жидкие среды используются с целью получения биомассы водорослей, необходимой для их использования; твердые – для хранения коллекционных (музейных) культур.

Большинство водорослей хорошо растет на минеральных средах. В то же время многие из них требуют для нормального роста наличия органических веществ. В таком случае водоросли выращивают на специализированных средах, куда добавляют различные органические соединения, например, вытяжки из торфа, почвы, иловых отложений и др.

Все питательные среды содержат основные биогенные элементы (N, P, S, Mg,

К, Са) и микроэлементы (Fe, Mn, Cu, Mo, Br, Zn и др.). Источником углерода служит растворенный в воде углекислый газ, запасы которого постоянно пополняются из воздуха. Чтобы железо и другие микроэлементы не выпадали в осадок, в среду добавляют хелатирующие соединения (органические вещества, образующие с ионами металлов устойчивые комплексные соединения в форме, доступной для питания растений), например, этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) или ее соли.

В качестве источника органических веществ иногда используют почвенную вытяжку. Среды, приготовленные с ее использованием, содержат микроэлементы и обладают хорошей буферностью по отношению к железу. Добавление почвенного экстракта к питательным средам благоприятно действует на развитие водорослей.

Существует много разных методов приготовления почвенной вытяжки. Чаще всего используют следующие способы.

Одну часть почвы и одну часть воды кипятят в течение 1 часа, настаивают 1 сутки и снова кипятят 1 час. Затем смесь охлаждают, фильтруют и стерилизуют в автоклаве.

Одну весовую часть просеянной почвы в течение 5 минут взбалтывают с четырьмя частями воды, фильтруют и стерилизуют в автоклаве.

Согласно другой рекомендации, 1 кг садовой земли кипятят 1 час в 1 л водопроводной воды. Настой отстаивают двое суток, затем сливают и стерилизуют. При употреблении настоей разбавляют шестью частями дистиллированной воды.

Для приготовления питательных растворов используют дистиллированную воду или простерилизованную водопроводную воду, а также химические реактивы с достаточно высокой степенью очистки (чда).

Посуду и инструменты тщательно моют, высушивают и, завернув в бумагу, стерилизуют в сушильном шкафу при 165-180⁰С в течение 2 часов. Стерилизацию растворов проводят в автоклаве сухим паром в течение 45-60 мин при давлении 980 гПа. Среды, содержащие легко разрушающиеся органические вещества (сахара, витамины) стерилизуют при 490 гПа в течение 15-30 мин. Иногда применяют дробную стерилизацию текучим паром в 3-4 приема (через 2-3 суток) в аппарате Коха или в автоклаве.

Чтобы избежать образование осадка в питательной среде, ее компоненты необходимо готовить отдельно в небольших объемах воды. Полученные растворы после стерилизации и охлаждения постепенно смешивают в необходимом объеме воды, добавляя их в той последовательности, в которой они записаны во взятом рецепте. В первую очередь это касается растворов микроэлементов, фосфатов, бикарбонатов, квасцов. Во время приготовления питательных сред необходимо соблюдать условия стерильности.

В литературе существует много разнообразных прописей питательных сред для культивирования разных систематических групп водорослей. Некоторые из них, наиболее часто используемые в практике, приведены в приложении 1.

ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОД ПО НАИБОЛЕЕ ПОКАЗАТЕЛЬНЫМ ОРГАНИЗМАМ

СИСТЕМА КОЛЬКВИТЦА-МАРССОНА И ЕЕ МОДИФИКАЦИИ

Оценка качества воды природных водоемов проводится с помощью различных методов. Наиболее распространенными являются биологические методы, которые позволяют обнаружить воздействие различных загрязнений на водоем, предшествующее времени анализа.

Оценка степени загрязнения вод по биологическим показателям, т.е., по составу фауны и флоры, осуществляется двумя путями:

- по индикаторным организмам;
- по результатам сравнения населения на участках, где загрязнение отсутствует, и на загрязненных участках.

В первом случае пользуются заранее разработанными системами индикаторных организмов, с помощью которых (по присутствию или отсутствию тех или иных видов и их относительному количеству) можно отнести водоем или его отдельные участки к определенному классу вод.

Во втором, – заключение дается по результатам сопоставления состава населения на разных участках водоема, в разной мере подверженных загрязнению.

Наиболее разработанным примером первого подхода служит, применяемая главным образом в европейских странах, система Кольквитца-Марссона и ее последующие модификации. Эти исследователи (Kolkwitz, Marsson, 1908, 1909) были пионерами в создании системы показательных организмов для оценки степени загрязнения (сапробности) вод, которая послужила основой для разработки многих последующих систем биологического анализа.

Кольквитц и Марссон установили четыре зоны загрязнения (олигосапробная, α -мезо – и β -мезосапробная, полисапробная) и дали списки видов-индикаторов, характерных для каждой из них. В дальнейшем списки видов претерпевали некоторые изменения - дополнялись и исправлялись. Списки основных видов-индикаторов сапробности представлены в приложении 2, а также в ряде методических руководств: Унифицированных методах исследования качества вод (1966) и в Избранных методах исследования вод (1972).

Многие затруднения, связанные с практическим использованием системы Кольквитца-Марссона, привели к неоднократным предложениям по ее усовершенствованию. В последующих разделах настоящей главы использованы материалы из обзора А.В.Макрушина (1974).

ВЫЧИСЛЕНИЕ СРЕДНЕЙ САПРОБНОСТИ БИОЦЕНОЗА

Результаты, основанные на использовании одних только видов-индикаторов, осложняют проведение оценки качества вод. Это в значительной степени связано с тем, что списки видов-индикаторов всегда содержат виды, относимые к разным зонам сапробности. Для преодоления этого затруднения в дальнейшем были предложены методы, позволяющие оценить среднюю сапробность биоценоза и облегчающие понимание результатов биологического анализа неспециалистами.

Метод представления результатов биологического анализа в графической форме был предложен Кнёппом (Knöpp, 1954, 1955).

Количество встреченных в пробе особей видов-индикаторов системы Кольквитца-Марссона оценивалось Кнёппом по семибальной шкале (1 – единично, 2 – мало, 3 – от мало до средне, 4 – средне, 5 – от средне до много, 6 – много и 7 – массово). Раздельно подсчитывалась сумма баллов олиго-, β -мезо, α -мезо – и

полисапробных видов. Найденные суммы откладывались на графике - на вертикальной оси, причем сумма баллов олиго-и β -мезосапробов принималась за положительные значения, а, α -мезо - и полисапробов, - за отрицательные. На горизонтальной оси откладывалось расстояние между станциями.

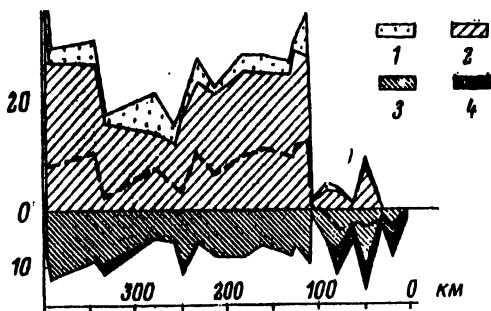


Рис. 10. Соотношение видов-индикаторов, характеризующих степень сапробности различных участков водоема

1 - олигосапробные организмы, 2 - β -мезосапробы, 3 - α -мезосапробы, 4 - полисапробы. Пунктирной линией обозначена кривая «центра тяжести», т.е., средний балл сапробности.

Соединя соответствующие точки прямыми линиями получают фигуру (рис. 10), которая визуально показывает соотношение видов-индикаторов (в пределах каждой зоны сапробности) в обследованных участках водоема. Из представленных результатов легко может быть получена кривая среднего балла (кривая «центра тяжести»), показывающая на какой ступени сапробности находится тот или иной участок водоема. Ее получают путем вычитания из суммы баллов больших значений - меньших. На рис.10 кривая «центра тяжести» обозначена пунктирной линией.

Представленные на рисунке 10 значения могут быть дополнены графиком «относительной чистоты» водоема (рис.11), показывающим отношение суммы баллов олиго-и β -мезосапробных организмов (в процентах) к сумме баллов всех показательных видов. Зеркальным отражением кривой «относительной чистоты» водоема является кривая «относительной загрязненности», показывающая отношение суммы баллов α -мезо - и полисапробов к сумме баллов всех показательных организмов.

Достоинство этих методов – выразительность графиков, с помощью которых можно наглядно показывать степень загрязнения водоема на разных его участках.

Пантле и Букк (Pantle, Buck, 1955; Pantle, 1956) предложили характеризовать степень загрязнения водоемов индексом сапробности (S). Для этого они приняли индикаторную значимость (s) олигосапробов за 1, β-мезосапробов – за 2, α-мезосапробов – за 3 и полисапробов – за 4. Относительное количество особей вида (h) оценивается следующим образом: случайные находки приняты за 1, частая встречаемость – 3 и массовое развитие – 5.

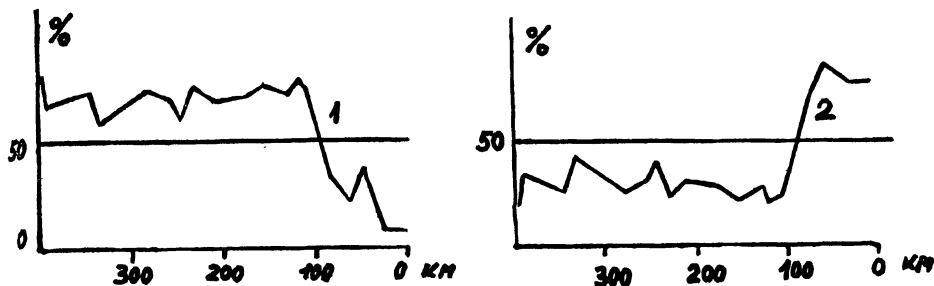


Рис.11. График «относительной чистоты» (1) и «относительной загрязненности» водоема (2)

Индекс сапробности обследуемой станции вычисляется по формуле:

$$S = \sum s h / \sum h$$

В полисапробной зоне он равен – 4,0-3,5 ; в β-мезосапробной зоне – 3,5-2,5 ; в α-мезосапробной зоне – 2,5-1,5 ; в олигосапробной зоне – 1,5-1,0.

Результаты, полученные с помощью этого метода, в основном отражают соотношение показательных организмов и совпадают с другими показателями загрязнения. Достоинство этого метода заключается в том, что с его помощью можно уловить различия внутри каждой из зон сапробности (Pantle, 1960).

Метод Пантле и Букка в некоторых случаях ведет к неверному истолкованию результатов биологического анализа, поэтому Головин (Golowin, 1968) предложил «векторный способ» нахождения средней сапробности исследуемой пробы.

По методу Головина абсолютное количество особей видов-индикаторов (из проанализированной пробы), наносят на соответствующую ось диаграммы, условно

названной автором “системой координат” (рис. 12). Чтобы откладывать на оси виды-индикаторы применяется определенный масштаб, например, 1 мм – 10 особей.

Полученные на осях 1-1У отрезки складывают по правилу сложения векторов и находят угол наклона среднего вектора S, показывающий, к какой ступени сапробности необходимо отнести данную пробу.

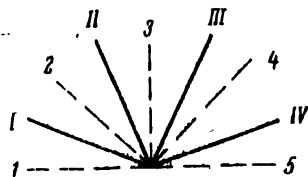


Рис.12. “Система координат” границ зон сапробности

1 – ось олигосапробов; 11 – ось β -мезосапробов; 111 – ось α -мезосапробов; 1У – ось полисапробов. Линиями 1, 2, 3 и 4 обозначены границы зон сапробности (олигосапробная зона находится между 1 и 2 линиями, β -мезосапробная – между 2 и 3 линиями, α -мезосапробная – между 3 и 4 линиями и полисапробная – между 4 и 5 линиями).

Диаграмма, представленная на рис.12; служит и для графического изображения показателя сапробности участка водоема. На рис.13 сведения об организмах – показателях сапробности представлены в виде площади равностороннего треугольника. Он построен так, чтобы 1 мм² его площади соответствовал определенному числу особей. Угол наклона вектора S (рис.13) показывает, к какой ступени сапробности может быть отнесена данная проба.

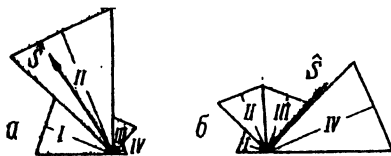


Рис.13. Графическое изображение спектра сапробности пробы двух участков водоема

1 – олигосапробы; 11 – β -мезосапробы; 111 – α -мезосапробы; 1У – полисапробы. (участок (а) следует отнести к β -мезосапробной, а участок (б) – к полисапробной зоне)

Ротшайн (Rotschein, 1959, 1962) предложил индекс сапробности, аналогичный индексу Пантле и Букка. При расчете этого индекса учитываются сапробные валентности и индикаторный вес показательных организмов по Зелинке и Марвану (см. ниже) (Zelinka, Marvan, 1961). Каждой ступени сапробности придается определенное числовое значение:

ксеносапробная ступень - $S_x = 90$,
олигосапробная ступень - $S_o = 70$,
 β -мезосапробная ступень - $S_\beta = 50$,
 α -мезосапробная ступень - $S_\alpha = 30$,
полисапробная ступень - $S_p = 10$.

Для отдельных ступеней сапробности подсчитывают, как при расчете средневзвешенных сапробных валентностей по Зелинке и Марвану, суммы P (ΣP), являющиеся произведением частоты встречаемости видов, их сапробной валентности и индикаторного веса.

Наибольшая ΣP и две соседних с ней ΣP для ступеней сапробности умножают на соответствующие значения $S_x \dots S_p$, полученные три произведения складывают и делят на сумму трех соответствующих ΣP ,

Индекс Ротшайна равен:

$$S = (S_1 \Sigma P_1 + S_2 \Sigma P_2 + S_3 \Sigma P_3) / (\Sigma P_1 + \Sigma P_2 + \Sigma P_3),$$

где: ΣP_2 является наивысшей ΣP .

Полученные значения индекса S истолковывают следующим образом:

ксеносапробная ступень – 90 – 80,
олигосапробная ступень – 80 – 60,
 β -мезосапробная ступень - 60 - 40,
 α -мезосапробная ступень – 40 - 20,
полисапробная ступень - 20 - 10.

При расчете индекса Ротшайна (в противоположность индексу Пантле и Букка) принимают во внимание не все виды показательных организмов, а только те, которые относятся к ступени с наибольшей ΣP и к двум соседним к ней.

В том случае, если наибольшая ЭР приходится на одну из крайних ступеней сапробности (ксеносапробную или полисапробную), при расчете индекса учитывается не две, а одна соседняя ступень. Если две ЭР равны, то также принимаются во внимание только две ступени сапробности.

УСТАНОВЛЕНИЕ САПРОБНЫХ ВАЛЕНТНОСТЕЙ И ИНДИКАТОРНОГО ВЕСА ПОКАЗАТЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗМОВ

Многие виды-индикаторы встречаются в водоемах двух или даже трех зонах сапробности, что является причиной неточности при установлении средней сапробности биоценоза.

Чтобы уточнить результаты биологического анализа Зелинка и Марван (Zelinka, Marvan, 1961, 1966) ввели понятие **сапробной валентности**. Сапробная валентность вида показывает в какой мере он характерен для той или иной ступени сапробности. Она выражается одной или несколькими цифрами, сумма которых для конкретного вида равна 10.

Сапробные валентности установлены авторами на основании многолетней регистрации сборов биологических проб, сравнивая их с химическими анализами среды обитания организмов и литературными данными.

Для того, чтобы при оценке степени загрязнения повысить роль видов, присутствие которых наиболее характерно для определенной ступени сапробности, по сравнению с видами, встречающимися в разных зонах сапробности, Зелинка и Марван ввели понятие **“индикаторный вес” (J)** организма. Он оценивается для каждого конкретного вида в баллах (от 1 до 5), который показывает насколько высоко индикаторное значение того или иного вида.

Для определения степени сапробности всего биоценоза рассчитывают средневзвешенные сапробные валентности для ксеносапробной ступени – А, для олигосапробной ступени – В, для β-мезосапробной ступени – С, для α-мезосапробной ступени – D, для полисапробной ступени – Е, по следующим формулам:

$$A = \sum_{i=1}^n h_i J_i / \sum h_i J_i ; \quad B = \sum_{i=1}^n b_i h_i J_i / \sum h_i J_i ; \quad \text{и т.д.}$$

где: b_i - величина, характеризующая количество особей i -того вида; J_i - индикаторный вес i -того вида; a_i, b_i, c_i и т.д. – сапробные валентности вида i .

Величины сапробной валентности и индикаторного веса организмов находят по специальной таблице (Zelinka, Marvan, 1961, 1966). Высчитываются произведения aJh, bJh, cJh и т.д. для каждого вида и их суммы. Эти суммы делятся на суммы произведений Jh . Полученные значения A, B, C, D, E являются средневзвешенными сапробными валентностями биоценоза, сумма которых равна 10.

Зелинка и Марван (Zelinka, Marvan, 1961, 1966) в своих работах приводят список видов-индикаторов сапробности с указанием их сапробных валентностей и индикаторного веса вида. Позже количество видов-индикаторов и их показательные характеристики были уточнены и расширены работами других авторов (Zelinka, Sladecsek, 1964; Sladecskova, Sladecsek, 1966; Sladecsek, 1969; Bick, Kunze, 1971).

Метод Зелинка и Марвана является наиболее усовершенствованной модификацией системы Кольквитца и Марссона. Однако возможность его широкого применения ограничена тем, что сапробные валентности и индикаторный вес организмов могут различаться в разных биотопах. Кроме того, некоторые специалисты считаются их недостаточно надежными показателями и отмечают трудоемкость самого этого метода (Wetzel, 1969).

РАСШИРЕНИЕ СИСТЕМЫ КОЛЬКВИТЦА-МАРССОНА

Система Кольквитца и Марссона разработана применительно к условиям загрязнения вод начала XX века. В настоящее время характер и степень загрязнения водоемов сильно изменились.

Для вод, загрязненных промышленными стоками, предложен термин **антисапробная зона** (Cygus, 1947); в водах, загрязненных токсичными веществами, различают две зоны – **хемобионтную** (где встречаются организмы) и **хемотоксичную** (где их нет) (Fjerdingstad, 1964) и даже четыре зоны (**олиго-, β -мезо-, α -мезо- и политоксичную**) (Лесников, 1973). Для вод, в которых сказывается действие минеральных взвесей или высокой температуры, предложен термин **криптосапробная зона** (Sladecsek, 1966, 1967).

Сладечек (1961) внутри полисапробной зоны различает три зоны – **изосапробную** (с преобладанием цилиат над флагеллятами), **метасапробную** (с преобладанием флагеллят над цилиатами) и **гиперсапробную** (отсутствие простейших при развитии бактерий и грибов). Этим автором (Sladecsek, 1967, 1969) сделана попытка сравнения некоторых бактериологических и химических показателей с отдельными ступенями сапробности и предложена общая биологическая схема качества вод.

А.С.Скориков (1909, 1911) предложил совсем иную классификацию видов-индикаторов. Он разделил эти показательные организмы по типу питания (на автотрофов, миксотрофов, амфитрофов и гетеротрофов) применительно к оценке качества питьевых вод на три группы:

1. **Катаробионты** – формы, характерные для планктона озер. Они не выдерживают присутствия в воде даже небольшого количества способных к гниению органических веществ;
2. **Альгобионты** – формы, типичные для прибрежных зарослей и планктона озер; могут жить при наличии некоторого количества разлагающихся органических веществ;
3. **Сапробионты** – организмы, использующие для жизнедеятельности мертвое органическое вещество.

Среди сапробионтов А.С.Скориков различает:

- а) **олигосапробионты** – организмы, обитающие на дне незагрязненных или слабозагрязненных водоемов;
- б) **месосапробионты** – организмы, характерные для загрязненных вод;
- в) **полисапробионты** – организмы, характерные для очень загрязненных вод.

Население озер по Скорикову состоит из трех групп – **катаробионтов** (планктонные организмы), **альгобионтов** (население прибрежных зарослей) и **олигосапробионтов** (обитателей дна).

По мнению Скорикова, увеличение в незагрязненных водоемах количества олигосапробионтов и альгобионтов за счет катаробионтов свидетельствует об ухудшении качества вод. Данная система может быть применена при оценке качества вод незагрязненных водоемов.

Система Кольквитца и Марссона, постоянно совершенствуясь, стала наиболее разработанной системой биологического анализа качества вод. Тем не менее многие специалисты указывают на ряд ее недостатков. Наиболее существенный недостаток этой системы – это громоздкость и трудоемкость при практическом использовании. Детальная обработка проб – необходимое условие использования системы Кольквитца и Марссона - требует много времени и квалифицированных специалистов по систематике флоры и фауны. Кроме того, отмечается необходимость дальнейшего совершенствования системы показательных организмов для более точной оценки уровня и биологических последствий загрязнения вод.

В настоящее время существует потребность в более простой и доступной системе биологического анализа водоемов. В связи с этим появилось много новых вариантов биологического метода оценки уровня загрязнения. Усилия специалистов направлены на поиск компромисса между точностью полученных данных и оперативностью их получения.

ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОД ПО ВИДОВОМУ РАЗНООБРАЗИЮ ОРГАНИЗМОВ

ИНДЕКСЫ ВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ

Эмпирические индексы загрязнения вод были введены в практику на основании наблюдений за постепенным исчезновением отдельных индикаторных видов в связи с увеличением поступления в них загрязняющих веществ. Поскольку в этом случае уменьшается видовое разнообразие организмов, то для оценки уровня загрязнения водоемов могут быть использованы различные индексы видового разнообразия.

Индексы видового разнообразия учитывают всю структуру исследуемого сообщества, а степень ее изменения в условиях токсического воздействия оценивают по разности одного и второго измерения.

В отличие от качественных индексов загрязнения, в формулах индексов видового разнообразия используется число видов (S) и их численность (N), поэтому в этом случае тип полученных данных только количественный.

Фишер с соавторами (Fisher et al., 1943) нашли, что логарифмический ряд хорошо передает расположение видов по их численности, и предложил константу α в качестве меры разнообразия:

$$\alpha = (\ln N_m - \ln N_1) / m,$$

где: N_m – численность вида m в ряду видов, ранжированных по численности;

N_1 – численность первого вида с наивысшей численностью;

m – порядковый номер вида в ряду 1, 2, 3, ... n .

Информационный индекс Шеннона (Shannon, 1948):

$$J = \sum_{r=1}^n p_r \log_2 p_r,$$

где: p_r - доля особей r -го вида ($r = 1, 2, 3, \dots, n$)

Информационный индекс Макинтоша (McIntosh, 1967):

$$J = \sqrt{\frac{n}{\sum_{i=1}^n n_i^2}},$$

где: n_i - число особей каждого вида.

В сущности эти оба индекса достаточно иллюстративны. Они могут быть использованы в качестве дополнения к другим более убедительным обоснованиям видового разнообразия организмов.

Индекс разнообразия Менгинника (Menhinick, 1964):

$$J = S / \sqrt{n},$$

где: S - число видов, n - число особей.

Индекс последовательного сравнения Кериса (Cairns et al., 1968):

$$J = R / N,$$

где: R - число изменений видов, N - общее число проанализированных видов.

Для изучения степени загрязненности вод требуется большое количество квалифицированных специалистов по систематике гидробионтов. Тогда как авторы этого индекса (Cairns et al., 1968) предлагают ограничиться только определением численности видов, которые хорошо различимы по форме тела, размеру, цвету и другим признакам. Исследования показали, что установленное таким образом количество “видов” приблизительно равно истинному количеству видов. Для определения индекса последовательного сравнения достаточно, когда в

анализируемой пробе находится 200-250 организмов. В незагрязненных водоемах индекс имеют значение 12 и выше, а в загрязненных – 8 и ниже (Макрушин, 1974).

Индекс разнообразия Маргалефа (Margalef, 1951, 1960):

$$J = (S - 1) / \ln n,$$

где: S - число видов, $\ln n$ - натуральный логарифм числа особей.

Индекс J принимает максимальное значение, если все особи принадлежат к разным видам ($S = n$) и равен нулю, когда все особи принадлежат к одному виду ($S = 1$).

Индекс разнообразия Симпсона (Simpson, 1949):

$$J = \sum p_i (p_i - 1) / [N (N - 1)],$$

где: N - число видов, p_i - число особей i -го вида. Здесь, чем выше значение индекса, тем меньше видовое разнообразие.

Общим недостатком всех приведенных выше индексов (за исключением индекса Симпсона) является широкий диапазон получаемых результатов самого индекса, что в существующем виде делает их трудносравнимыми между собой. Последнее устранимо путем приведения их к виду, где шкала индекса изменялась бы от нуля до единицы.

Представляется необходимым, чтобы этому условию отвечали все индексы, имеющие какую-либо экологическую ценность. В такой интерпретации результаты легко представлять в процентах, что сделало бы их удобными в обращении.

Вместе с тем нельзя не отметить, что приведенные выше индексы видового разнообразия, за исключением индекса Шеннона, носят фрагментарный характер. Во всех сообществах имеются доминантные виды, обладающие высокой численностью особей, субдоминантные и случайные виды, число которых достаточно велико, а их численность крайне низкая. Кроме того, характер доминирования претерпевает сезонные и пространственные изменения.

Частично решению этого вопроса отвечает индекс видового разнообразия Маргалефа (Margalef, 1958, 1963):

$$J = 1,443 \ln [N! / (n_1! + n_2! + \dots + n_s!)],$$

где: N - число видов в данном биотопе (участке), n_1, n_2, \dots, n_s - численность организмов отдельных видов.

Абсолютная величина индекса возрастает за счет видов, численность которых наименьшая, т.е., за счет случайных видов, трофическая значимость которых в данный момент незначительна. Это обстоятельство снижает ценность указанного индекса.

ИНДЕКС СХОДСТВА (СРАВНЕНИЯ)

Показатели сходства организмов, предложенные разными авторами, могут быть использованы для оценки уровня загрязнения среды, так как сами загрязнения оказывают влияние на состав биоценоза.

Первая попытка количественного выражения степени сходства между сообществами принадлежала швейцарскому натуралисту **Жаккару**, и его коэффициент флористического сходства до сих пор широко используется в биологических исследованиях (Jaccard, 1908):

$$K = [c / (a + b - c)] 100 ,$$

где: **a** – число видов первого сообщества, **b** - число видов второго сообщества, **c** - число видов, общих для обоих участков.

Позднее **Жаккард** (Jaccard, 1912) рассчитывал индекс сходства уже по другой формуле:

$$K = [(c / (a + b))] 100 ,$$

Кульчинский (Kulczynski, 1927) предложил вычислять коэффициент общности по формуле:

$$K = \frac{1}{2} (1/a + 1/b) ,$$

где: **a** и **b** - число видов встречающиеся только на участках **A** и **B**.

Гидробиологи чаще всего применяют коэффициент общности видового состава **Сёренсена** (Sørensen, 1948). Она отражает общие положения теории множеств, в то время как формула Жаккара выведена эмпирически и по сравнению с формулой Серенсена дает занижение результатов на 15-20% (Константинов, 1969).

Формула общности видового состава **Сёренсена**:

$$K = 2 j / (a + b) ,$$

где: J - число видов, общих для сравниваемых участков;

a и b – число видов на двух разных участках.

Маунтфорд (Mountford, 1962) для расчетов использовал следующую формулу:

$$J = 2c / [2ab - (a + b)c],$$

где: a - число видов 1-го сообщества, b - число видов 2-го сообщества, c - число общих видов.

В частности, при $a = b = c$, т.е., в идеальном случае для чистых сообществ, коэффициент Кульчинского, Серенсена, Жаккарда равны единице. В случае, если два сообщества не имеют общих видов ($C = 0$), коэффициенты этих трех уравнений и уравнение Маунтфорда обращаются в нуль. При $a = b$ коэффициент Кульчинского и Серенсена равны. При $a \neq b \neq c$ все четыре уравнения приводят к различным результатам.

Индекс Чекановского (Chekanowski, 1913):

$$J = 2w / (A + B),$$

где: w – сумма меньших значений обилия видов, общих для обоих сообществ;

A, B – суммы значений обилия, соответствующих сообществам A и B .

Индекс сходства Раабе (Raabe, 1952):

$$J = \sum_{\min} (a, b, c, \dots n),$$

где: $a, b, c, \dots n$ - минимальные значения (в %) каждого вида, общего для обоих сообществ.

Достоинством двух последних индексов сравнения, в отличие от первых четырех является то, что они относятся к видам, общим для обоих сообществ, имеющих минимальную численность.

Б.А.Вайнштейн (1967) для оценки сходства биоценозов по обилию и видовому составу применил коэффициент биоценологического сходства (K_6):

$$K_6 = K_0 K_b / 100,$$

где: K_b – коэффициент сходства видового состава, K_0 – коэффициент общности удельного обилия.

Коэффициент K_b рассчитывают следующим образом:

$$K_b = V_3 100 / (V_1 + V_2 - V_3),$$

где: V_1 и V_2 - число видов первого и второго биоценозов, V_3 - число видов, общих обоим биоценозам.

Для вычисления коэффициента K_0 сначала определяют удельное обилие каждого вида в каждом биоценозе, т.е., процент числа особей данного вида от общего их числа в биоценозе:

$$0 = (n / N) 100 ,$$

где: 0 – удельное обилие, n - обилие (число особей) на пробу, N - суммарное обилие всех видов.

Затем в двух сравниваемых биоценозах, удельные обилия общих им видов сравниваются, отбираются меньшие величины для каждого вида и суммируются:

$$K_0 = \Sigma 0_{\min}$$

где: 0_{\min} - меньшее из каждой пары сравниваемых обилий.

В тех случаях, когда необходимо одновременно оценить видовые и численные значения, используют коэффициент абсолютного сходства, предложенный А.С.Константиновым (1969):

$$K_a = 2 \Sigma x_{i \min} / (\Sigma x_{ij} + \Sigma x_{ik}) ,$$

где: K_a – коэффициент абсолютного фитоценотического сходства, $x_{i \min}$ - меньшая биомасса (численность) вида i в двух сравниваемых пробах, Σx_{ij} - биомасса (численность) всех видов в пробе j , Σx_{ik} - то же в пробе k .

В настоящее время продолжают поиски, объединяющих количественные и качественные характеристики экосистем. Так, например, в системе гидрометеослужбы РФ оценка состояния сообществ планктона и бентоса вычисляется по следующей формуле (Абакумов, 1978):

$$S_m = (S_1 \Sigma h_1 + S_2 \Sigma h_2 + S_3 \Sigma h_3 + S_4 \Sigma h_4) / (\Sigma h_1 + \Sigma h_2 + \Sigma h_3 + \Sigma h_4) ,$$

где: S_1, S_2, S_3, S_4 - индексы сапробности проб соответственно зообентоса, макрофитов, фитопланктона, зоопланктона, $\Sigma h_1, \Sigma h_2, \Sigma h_3, \Sigma h_4$ – сумма значений частот встречаемости организмов зообентоса, макрофитов, фитопланктона, зоопланктона.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОДУКЦИИ ФИТОПЛАНКТОНА

При обсуждении методов, используемых для оценки продукции фитопланктона, необходимо иметь в виду особенности среды их обитания. В водоеме основная часть света поглощается верхним слоем воды, в результате чего фотосинтез может осуществляться только там, куда проникает солнечный свет. Поэтому наиболее значимым фактором среды для подводного фотосинтеза является свет. Он определяет толщину фотического слоя водоема. Проникновение света в толщу воды определяет величину первичной продукции под единицей площади того или иного водоема.

В настоящее время измерения первичной продукции основаны в основном на двух различных подходах.

Одним из основных является метод определения первичной продукции в изолированных объемах воды с естественным сообществом фитопланктона. Это скляночный метод в двух модификациях – кислородной и радиоуглеродной. Пробы экспонируются на тех же глубинах, где они были отобраны (так называемые измерения *in situ*), или в искусственных условиях – при солнечном освещении или под лампами. Преимущества такого подхода заключаются в возможности изучения продукционных процессов непосредственно в среде обитания водорослей. Однако при этом необходимо иметь в виду изменения скорости фотосинтеза под влиянием изолирования образцов воды с фитопланктоном, воздействие так называемого «скляночного эффекта».

Другой метод основан на измерении содержания в водорослях фотоактивных пигментов. В этом случае принимается наличие прямой зависимости между интенсивностью фотосинтеза и концентрацией некоторых пигментов (обычно хлорофилла *a*). Однако необходимо иметь в виду, что расчет на основании определения концентрации хлорофилла дает достаточно грубую оценку первичной продукции, поскольку количество ассимилируемой в ходе фотосинтеза углекислоты одной весовой единицей хлорофилла в единицу времени (так называемое ассимиляционное число – АЧ) варьирует весьма существенно в зависимости от факторов среды, физиологического состояния и состава фитопланктона (Федоров,

1979). Вместе с тем очевидная простота спектрофотометрического измерения хлорофилла *a* позволяет рекомендовать хлорофильный метод для гидробиологических исследований.

ОТБОР ПРОБ

Отбор проб для определения первичной продукции проводится так же, как и при изучении видового состава и биомассы фитопланктона.

При отборе проб воды с исследуемого горизонта необходимо иметь в виду следующее. Объем батометра должен быть достаточно большим, чтобы количество воды хватило не только для заполнения всех продукционных склянок, но и для учета биомассы фитопланктона, пигментов, а при необходимости, и для проведения других сопутствующих анализов. Для этих целей в пресных водоемах рекомендуется использовать 1-, 3-, 5-литровые пластиковые батометры из непрозрачного материала.

Металлические и прозрачные батометры для изучения продукционных процессов не подходят; металл влияет на продукционные показатели фитопланктона, а яркий свет ингибирующе действует на водоросли. При отсутствии необходимых мер предосторожности (затенения) фитопланктон подвергается хотя и кратковременному, но сильному облучению дневным светом. Из-за светового шока фотосинтетические процессы фитопланктона как бы замирают на 30-60 мин (Федоров, 1979). Необходимо иметь в виду и другое. При отборе проб батометром и заполнении склянок происходит механическое воздействие на живой планктон, особенно на колониальные водоросли. Это тоже может сказаться на результатах исследований.

ГЛУБИНА, НА КОТОРОЙ ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ ФОТОСИНТЕЗ

Глубина расположения горизонтов, на которых определяется фотосинтез, зависит от прозрачности воды и количества проникающего света. Исходные данные по фотосинтезу должны быть получены с 5-7 горизонтов фотического слоя водоема. За нижнюю его границу рекомендуется принимать глубину проникновения 1%

солнечного света от измеренного в поверхностном горизонте.

При этом можно придерживаться следующих рекомендаций – измерение фотосинтеза необходимо проводить на глубинах, куда проникает 100%, 50%, 10%, 5%, 2% от падающего на поверхность света. Например, на водоемах с прозрачностью по диску Секки 2 м такими глубинами могут быть: поверхностный слой, 0,25 м, 0,5 м, 1 м, 2 м, 3 м, 4 м.

Более частое расположение первых горизонтов обусловлено необходимостью уловить максимум фотосинтеза, который обычно находится в верхней части фотического слоя, где задерживается более половины проникающего света.

ПРОДУКЦИОННЫЕ СКЛЯНКИ

При изучении продукции фитопланктона в качестве изолирующего агента используют стеклянные сосуды. Однако стекло поглощает часть солнечного света, особенно в коротковолновой области спектра, поэтому световые условия в склянках будут несколько отличаться от естественных. При этом поглощение света зависит от качества стекла; исследователи отмечают различие фотосинтеза в склянках из стекла разного качества, кварцевой, пластиковой посуды и др. Поэтому выбор марки стекла имеет существенное значение при изучении первичной продукции.

Для рутинных гидробиологических работ наиболее удобны склянки, изготовленные из стекла «Пирекс», оптические свойства которого имеют преимущества по сравнению с другими марками. Сосуды из кварцевого стекла слишком дорогие, а пластиковые, хотя и обладают хорошими оптическими свойствами, быстро зарастают бактериями.

Для изучения продукционных процессов используют округлые или плоские склянки с притертыми пробками объемом 100-300 мл. «Темные» склянки получают следующим образом: заворачивают их темной изоляционной лентой или алюминиевой фольгой. Темные мешки, которые рекомендуются в ряде руководств, неудобны в работе, поэтому от них следует отказаться.

В природных условиях фитопланктон существует в турбулентном потоке воды, который улучшает снабжение организма питательными веществами и удаляет

продукты метаболизма. Кроме того, токи воды препятствуют оседанию клеток, которое обычно наблюдается при экспозиции склянок. Поскольку в небольшом объеме склянок перемешивание нарушается, часть водорослей оседает на дно сосуда, другие (в частности, синезеленые), наоборот, всплывают. В результате этого ухудшаются условия обмена клетки с окружающей средой и освещения, что сказывается на интенсивности фотосинтеза.

Кроме того, при высокой плотности фитопланктона в склянке быстро истощаются запасы питательных веществ, происходит изменение значений pH, концентрации общей и свободной углекислоты и др. Это, несомненно, сказывается на скорости фотосинтеза. Такой «скляночный эффект» наиболее остро проявляется при длительных экспозициях проб. Прижизненные выделения водорослей создают благоприятные условия для развития бактерий, что вносит свою ошибку при определении первичной продукции кислородным методом.

В результате экспозиции возможно усиленное развитие водорослей, нетипичных для планктона исследуемого водоема. Возможен прирост бактерий, которые влияют на интенсивность деструкционных процессов. За счет фотосинтеза изменяется химический состав водной среды в склянках (например, pH, содержание CO₂, бикарбонатов, O₂). Некоторые биогенные элементы (например, соединения железа и фосфора) сорбируются на стенках сосудов.

Чтобы в какой-то мере увеличить перемешивание воды в склянках во время их экспонирования в толще воды, их подвешивают к буйку на специальном пружинном устройстве. Парусность буйка и пружинное устройство даже при небольшом волнении способствует в какой-то мере «перемешиванию» пробы.

В мелководных водоемах или в мутных водах, в которых фотический слой не превышает 1 м, для определения первичной продукции используют стеклянные трубки длиной до 1 м. Они имеют вид цилиндра с двумя притертыми пробками (верхней и нижней).

Цилиндром «вырезают» столб воды, закрывают его пробками и экспонируют вертикально, также как и обычные производственные склянки. Таким способом получают интегрированные величины фотосинтеза всего фотического слоя водоема. Длинные производственные склянки весьма удобны при работах в мелких водоемах.

однако проблема, связанная с оседанием водорослей в них, стоит более остро, чем в небольших по размеру склянках. Осевшие водоросли, кроме всего прочего, оказываются в крайне неблагоприятных световых условиях. Чтобы избежать этого, эти длинные продукционные склянки необходимо периодически переворачивать или перемешивать осторожным взбалтыванием.

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЭКСПОНИРОВАНИЯ ПРОБЫ

Время экспозиции склянок *in situ* не должно быть меньше 2 ч и превышать половину светового дня. Экспозиция меньше 2 ч повышает возможность влияния ошибки, связанной с временным шоком фитопланктона, вызванным воздействием света при заполнении склянок водой. При более длительных экспозициях возможны ошибки за счет так называемого «скляночного эффекта» (изменения газового режима, концентрации биогенных элементов, развития бактерий, оседания водорослей и др.).

Поэтому исследователи находят своеобразный компромисс. Причем, в этом вопросе нет единой точки зрения. Одни считают, что экспозиция проб не должна превышать 4-6 ч (Федоров, 1979). Другие – склоняются к более длительному времени экспозиции: 6-12 ч для эвтрофных водоемов, 12-24 ч – для мезотрофных (Романенко, Кузнецов, 1974; Пырина, 1975).

Приверженцы короткого времени экспозиции указывают, что в продуктивных водах и в период массового развития фитопланктона даже при коротких опытах (в пределах 1 часа) в склянке может иметь место пересыщение воды кислородом и образование пузырьков газа. Кислород, при его фиксации реактивами Винклера чаще всего теряется. Кроме того, в склянке увеличиваются значения рН, что отрицательно сказывается на продукционных процессах.

Поток солнечной радиации в течение светового дня непрерывно изменяется, что порождает трудности в обосновании наилучшего времени начала экспозиции. Эту проблему снимает длительное время экспозиции проб. Поэтому, несмотря на физиологические преимущества, результаты опытов с короткой экспозицией оказываются не вполне подходящими, т.к., при расчетах приходится делать

допущения на изменение в течение дня освещенности и, возможно, фотосинтетической способности фитопланктона.

В.Д. Федоров (1979) рекомендует руководствоваться следующими правилами, соблюдение которых облегчает последующие корректировки в расчетах первичной продукции.

1. Точкой отсчета времени экспозиции следует делать полдень, отступая от 12 часов в «начало» и «конец» дня.
2. Время экспозиции не должно быть больше половины светового дня за вычетом одного часа, в течение которого солнце находится у горизонта, и основная часть его лучей отражается от водной поверхности. Таким образом, время фотосинтеза в течение светового дня приблизительно равно периоду между восходом и заходом солнца за вычетом 2-х часов (Федоров и др., 1974), что существенно для расчета величин дневной продукции фитопланктона.
3. Для получения более точных оценок дневной продукции фитопланктона необходимо суммировать результаты последовательных краткосрочных измерений продукции (3-4-часовых). Такие опыты дают результаты, наиболее близкие к «истинным», и имеют преимущество, особенно в тех случаях, когда наблюдаются суточные изменения в концентрации, видовом составе и фотосинтетической активности фитопланктона. Однако они весьма громоздки и требуют больших затрат времени и сил.
4. Допустимо для каждого конкретного водоема установить эмпирическую количественную зависимость между продукцией, измеренной в течение короткого интервала времени определенной части суток, и продукцией полного дня с тем, чтобы по результатам оценки первой рассчитать вторую.

УСЛОВИЯ ЭКСПОНИРОВАНИЯ ПРОБ

В опытах *in situ* экспонирование продукционных склянок на определенном горизонте обычно осуществляется с помощью поддерживаемого в вертикальном положении троса с крючками или зажимами. Обычно на каждом горизонте подвешивают как минимум две «светлые» и две «темные» склянки. Склянки при

экспозиции следует располагать в горизонтальном положении. При таком их положении продукция фитопланктона получается более высокой. Кроме того, необходимо следить, чтобы подвешенные на тросе склянки не затеняли друг друга. Для этой цели используют специальные производственные плотки разной конструкции (Хромов, Семин, 1975).

При изучении первичной продукции на больших водоемах, проводимых на экспедиционных судах, регулярные опыты *in situ* невозможны, т.к. они связаны с длительной стоянкой судна. Поэтому эксперименты проводят непосредственно на судне в специальных “инкубаторах”, различающихся в зависимости от того, какой свет – искусственный или солнечный – в них используется.

В инкубаторах, рассчитанных на солнечный свет, часто применяются светофильтры (нейтральные и цветные), позволяющие имитировать условия освещения на различных глубинах. Температура в таких инкубаторах обычно поддерживается близкой к естественной с помощью тока заборной воды. В инкубаторах с искусственным освещением интенсивность света и температура обычно задаются постоянными (Пырина, 1975).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ФОТОСИНТЕЗА

Мерой первичной продукции служит скорость образования органического вещества автотрофными организмами, отнесенная к единице площади или объему водоема. Ее выражают в единицах массы, энергии или в эквивалентных показателях в единицу времени.

Как известно, фотосинтез, а, следовательно, образование органического вещества происходит только на свету при участии хлорофилла. При этом поглощается углекислота и выделяется свободный кислород. Определяя на свету и в темноте количество поглощенной углекислоты или количество выделившегося кислорода при фотосинтезе, можно получить представление о величине первичной продукции.

Различают валовую и чистую (= эффективную) первичную продукцию. Термин «валовая продукция» относится ко всему вновь созданному фототрофными организмами органическому веществу. Она представляет собой результат истинного

фотосинтеза, т.е. скорость образования при фотосинтезе органического вещества. Однако часть образованных продуктов фотосинтеза сразу же используется в процессе дыхания самих фотосинтезирующих организмов. Оставшаяся часть, которая представляет собой разность между валовой продукцией фитопланктона и тратами на обмен, идущая на прирост массы фотосинтезирующих организмов, называется чистой или эффективная продукция.

Для определения количества синтезированного водорослями органического вещества (иными словами – скорости фотосинтеза планктона), широкое распространение получил скляночный метод в кислородной и радиоуглеродной модификациях. Сущность этих методов и техника их исполнения изложены в ряде методических руководств (Винберг, 1960; Сорокин, 1973; Романенко, Кузнецов, 1974; Федоров, 1979).

СКЛЯНОЧНЫЙ МЕТОД В КИСЛОРОДНОЙ МОДИФИКАЦИИ

В пресных водоемах широко используется кислородный метод определения первичной продукции. Этот метод предложен Г.Г.Винбергом в 1934 г. в результате исследований на подмосковном озере Белом. На этом озере 25 мая 1932 г. были впервые сделаны измерения фотосинтеза планктона методом склянок для изучения его продукции. Эта работа открыла целую эпоху в гидробиологии и положила начало планомерным продукционным исследованиям различных водоемов (Алимов, 1989). Кислородный метод позволяет определять валовую и чистую продукцию и дыхание планктонного сообщества.

Процедура определения скорости фотосинтеза достаточно проста и позволяет использовать этот метод для широкого его применения в водоемах с относительно высокой концентрацией фитопланктона (в основном, в мезотрофных и эвтрофных). Это необходимо для того, чтобы получить достоверные результаты между начальным и конечным содержанием растворенного кислорода в светлых и темных склянках после инкубационного периода.

По убыли содержания кислорода в темной склянке (по сравнению с исходной) судят о скорости потребления кислорода планктоном, который соответствует скорости минерализации или деструкции органического вещества в процессе

дыхания. Разность между концентрацией кислорода в светлой склянке и начальной – это активность чистого фотосинтеза (т.е., чистая продукция). Сумма чистой продукции и дыхания – является валовой продукцией (разница между содержанием кислорода в светлой и темной склянках после времени экспозиции).

Таким образом, различие в содержании кислорода является единственной величиной, необходимой для расчета первичной продукции. Поэтому точность измерения концентрации растворенного в воде кислорода является основным условием используемого метода. В связи с этим применение кислородного метода в олиготрофных водах ограничено из-за невысокой чувствительности. С помощью этого метода можно исследовать только водоемы с высокой биомассой фитопланктона (не менее 1 мг хлорофилла в 1 м³ воды), и, соответственно, высоким уровнем первичной продукции в единице объема воды.

Концентрация растворенного кислорода в воде определяют химическим методом (метод Винклера) или используют электрохимические измерения (полярографический метод).

Неоспоримые достоинства метода Винклера сделали химический анализ растворенного кислорода в воде в сочетании с техникой светлых и темных склянок классической процедурой изучения продукционно-деструктивных процессов в водоемах.

К числу достоинств метода определения первичной продукции кислородным методом следует прежде всего отнести: высокую точность единичного измерения содержания кислорода в воде (до $\pm 0,02$ мг O₂/л) и возможность увеличения времени анализа. Последнее связано с тем, что добавление химических реагентов в продукционную склянку консервирует биологическую активность находящихся там организмов. Сохранение таких фиксированных образцов в течение 2-3 дней допускается после образования осадка окиси марганца в щелочных условиях или даже после выделения свободного йода. Это позволяет зафиксировать содержимое склянок «в поле» так, чтобы после их транспортировки можно было продолжить анализ содержания O₂ в лабораторных условиях.

Перечень источников возможных ошибок O₂-метода достаточно подробно обсуждается в работе Г.Г.Винберга (1960). Значительная часть ошибок вызвана

длительной (превышающей 6 ч) экспозицией образцов природного фитопланктона. Поэтому для начала рассмотрим ошибки, не связанные со временем экспозиции продукционных склянок.

Наиболее обычный источник ошибок связан с наличием пузырьков воздуха или кислорода в склянке. Воздух попадает в склянку в процессе их заполнения водой. Кроме того, пузырьки могут появиться во время экспозиции склянок при резких изменениях температуры. Газообразный кислород появляется за счет интенсивного фотосинтеза, который приводит к пересыщению воды выделившимся кислородом. Пузырек O_2 , выпущенный из склянки во время фиксирования пробы, может быть источником существенной ошибки анализа. Чтобы избежать этого, необходимо перед открыванием склянки несколько наклонить ее и постараться сместить пузырек в угол склянки под воду. Тогда в момент добавления химических реактивов пузырек останется под слоем жидкости и содержащийся в нем кислород будет зафиксирован.

Погрешности могут возникнуть за счет различного потребления кислорода при дыхании организмов на свету и в темноте. Кроме того, дыхание может зависеть от содержания кислорода, которое в «светлых» и «темных» склянках тоже разное.

Еще один источник ошибок связан с адсорбцией выделившегося свободного йода (в процессе анализа кислорода методом Винклера) организмами планктона и детритом. Процесс адсорбции обратим, что заметно на конечной стадии титрования йода раствором тиосульфата натрия (проба через некоторое время вновь синее). В то же время специалисты полагают, что именно относительно малая скорость десорбции дает иногда размытость перехода окраски в момент окончания титрования в присутствии крахмала как индикатора.

Необходимо также иметь в виду, что присутствие значительного количества окислителей (перекисей, некоторых органических соединений) может быть источником завышения результатов, если окислители вступают в реакцию вместо свободного кислорода.

Процедура определения продукции O_2 -методом достаточно проста. Исследуемая вода вместе с фитопланктоном со всеми предосторожностями, необходимыми при анализе кислорода (Алекин, 1954), разливается в продукционные

склянки с притертыми пробками. Склянки заполняют водой доверху; при притирании пробок следят, чтобы в склянки не оставалось пузырьков воздуха. Для определения продукции необходимо иметь не менее 6-9 склянок. В двух-трех из них фиксируют кислород сразу же после заполнения (для определения его начального количества). Оставшиеся - экспонируют на свету (2-3 склянки) и в темноте (2-3 склянки) в течение определенного периода времени (4-8 ч) в зависимости от интенсивности выделения кислорода фитопланктоном. Некоторые специалисты (Федоров, 1979) рекомендуют использовать не менее пяти светлых и пяти темных склянок.

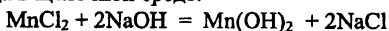
Чем выше продуктивность, тем меньше время экспозиции склянки (во избежание пересыщения воды кислородом, поскольку в этом случае возможны его потери из-за выделения в газообразном виде). Кроме того, при длительном времени экспозиции наблюдается подавление жизнедеятельности водорослей и их фотосинтетической активности.

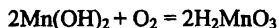
При экспонировании склянок нельзя допускать их нагревание, особенно при работе с природным фитопланктоном.

После экспозиции в каждую склянку добавляют последовательно 1 мл NaOH + KJ и 1 мл $MnCl_2$ для связывания растворенного в воде кислорода (32%-ный раствор $MnCl_2$; 32%-ный NaOH + 10%-ный KJ). При внесении растворов пипетку следует опустить до дна склянки и быстро выпнуть ее с таким расчетом, чтобы во время поднятия пипетки 1 мл раствора был внесен в склянку. Склянки снова закрывают притертыми пробками, чтобы в них не осталось пузырьков воздуха. Содержимое тщательно перемешивают (энергичным переворачиванием) и ставят в темноту на 2 ч для образования осадка. Через 2-3 ч зафиксированный кислород растворяют добавлением 1-3 мл концентрированной серной кислоты и хорошо перемешивают. Выделившийся йод сразу же титруют 0,01 N раствором тиосульфата до появления еле заметной желтой окраски. Затем добавляют 1 мл 0,2%-ного раствора крахмала и жидкость дотитровывают до полного исчезновения синей окраски. Для титрования из продукционной склянки берут 50 мл жидкости.

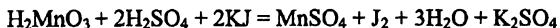
Сущность происходящей реакции состоит в следующем:

а) связывание кислорода в щелочной среде:

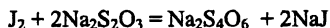




б) выделение йода в кислой среде:



в) титрование выделившегося йода тиосульфатом:



Для приготовления 0,01 N раствора тиосульфата берут 2,48 г соли, растворяют ее дистиллированной водой в 1-литровой колбе. Раствор тиосульфата готовят сначала приблизительно, затем находят для него поправку путем титрования точным раствором бихромата калия ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Более подробно процедура определения кислорода в воде описана в методических руководствах (Строганов, Бузинова, 1969; Руководство по химическому анализу ..., 1973).

Надежность результатов достигается строгим соблюдением необходимых приемов процедуры анализа.

Фиксированные пробы (лучше всего в виде осадка) должны храниться не более суток в темноте, при низкой температуре. Время, необходимое для титрования пробы, и количество индикатора (крахмала), по возможности, должно быть постоянным. Йод является хорошим окислителем, поэтому титрование пробы должно происходить быстро.

Колбу после титрования пробы необходимо тщательно промыть от остатков йода и тиосульфата. То же самое проделывают и со склянками. Их перед опытом тщательно промывают в течение нескольких часов в разбавленном растворе тиосульфата (0,01 N) для удаления следовых количеств йода от предшествующих определений. Затем промывают слабой кислотой и тщательно ополаскивают дистиллированной водой.

Концентрацию кислорода в воде рассчитывают по следующей формуле:

$$\text{O}_2 (\text{мг/л}) = n \cdot K \cdot 0,08 \cdot 1000 / (V_1 - V_2),$$

где: n - количество тиосульфата, пошедшее на титрование пробы (мл);

V_1 - объем продукционной склянки (мл);

V_2 - объем добавленных в склянку реактивов для фиксирования кислорода (мл);

K – поправка к титру тиосульфата;

0,08 – коэффициент для пересчета тиосульфата в мг кислорода (1 мл тиосульфата эквивалентен 0,08 мг O_2);

1000 – перевод мл в литры.

РАДИОУГЛЕРОДНАЯ МОДИФИКАЦИЯ СКЛЯНОЧНОГО МЕТОДА

Радиоактивный изотоп углерода ^{14}C впервые был применен для измерения первичной продукции датским ученым Стиманом-Нильсоном в 1950 г. во время морской экспедиции на исследовательском судне «Галатей» (Steehan-Nilson, 1951, 1952).

С тех пор скляночный метод в радиоуглеродной модификации (или просто радиоуглеродный метод) интенсивно совершенствовался и в настоящее время фактически стал основным методом оценки первичной продукции в морях и олиготрофных пресных водоемах, а также на больших глубинах продуктивных водоемов, где фотосинтез по приросту кислорода неощутим. Кроме того, этот метод широко используется при физиологических и трофологических исследованиях фитопланктона.

Изотоп ^{14}C , по сравнению с другими изотопами, имеет ряд преимуществ: он относительно безопасен для здоровья (имеет слабое β -излучение), кроме того, образцы планктона в подходящих условиях могут храниться в течение многих месяцев без заметного падения активности, поскольку период полураспада этого изотопа составляет 4700 лет.

Радиоуглеродный метод определения продукции основан на том допущении, что в процессе фотосинтеза меченая по углероду углекислота используется водорослями так же, как и немеченая. Поэтому, если измерить содержание углекислоты в склянке с фитопланктоном, затем добавить туда меченую углекислоту известной активности, проэкспонировать пробу на свету и с помощью радиоаппаратуры измерить количество включенной планктоном метки, можно рассчитать количество ассимилированной на свету углекислоты (т.е., определить продукцию фитопланктона).

Для оценки величины продукции фитопланктона необходимо знание трех основных величин (Федоров, 1979):

- начальное содержание в пробе неорганического углерода во всех формах (C_k) (мг/л);
- общую активность препарата ^{14}C , добавляемого в склянку с фитопланктоном (до экспозиции), так называемую исходную активность (R);
- активность фитопланктона (задержанного фильтром) после некоторого времени экспозиции на свету с препаратом изотопа (r).

Исходя из величин внесенной в пробу и накопленной водорослями радиоактивной метки, зная содержание в среде растворенного неорганического углерода, рассчитывают скорость фотосинтеза (мг $C/л$) за время опыта по следующей формуле:

$$\text{мг } C/л = r C_k / R t,$$

где: R – радиоактивность внесенного в пробу препарата (имп/мин мл или микрокури);

r – радиоактивность, накопленная водорослями в процессе фотосинтеза за время t (имп/мин мл или микрокури);

C_k – содержание минерального углерода в среде (мг $C/л$);

t – время экспозиции пробы (ч).

Определение первичной продукции радиоуглеродным методом следует рассмотреть подробнее, так как в гидробиологических исследованиях пресных вод этот метод менее распространен, чем кислородный.

При определении продукции ^{14}C -методом объем пробы, отбираемый одним батометром, должен быть достаточен для всех последующих операций (заполнения светлых и темных продукционных склянок, определения количественного состава фитопланктона, химических и иных анализов и др).

Пробы, отобранные с различных горизонтов, разливают в продукционные склянки объемом 100-150 мл (не менее 7-8 штук) и помещают в темный ящик, защищенный от света.

В первых 2-3-х склянках определяют рН и общее количество всех форм неорганического углерода титриметрическим методом (Романенко, Кузнецов, 1974). Измерение содержания неорганического углерода и рН следует проводить сразу же после отбора проб прямо на борту судна или в лаборатории (не позже 3-4 часов после

отбора проб). При этом следует иметь в виду, что показания щелочности изменяются в течение этого времени незначительно, тогда как показания pH могут существенно смещаться.

В три светлые и две темные склянки пипеткой (или шприцом) вводят 0,1-0,2 мл радиоактивного раствора бикарбоната натрия ($\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$) общей активностью около 16 мккюри (или же 6 млн. имп/мин). Такое количество раствора изотопа вносится в склянки при изучении первичной продукции в олиготрофных водоемах и просчете радиоактивности фильтров под торцовым счетчиком (Бульон, 1983). При использовании сцинтилляционного счетчика можно обойтись меньшим количеством раствора изотопа (более подробно будет рассмотрено в следующем разделе). Вода в продукционных склянках не должна быть заполнена доверху, чтобы удобно было вводить раствор изотопа.

Количество вносимого в склянку изотопа может варьировать в зависимости от плотности фитопланктона, времени экспозиции, экспериментальных задач и используемых для регистрации радиоактивности счетчиков (торцовых или жидкостных сцинтилляционных).

Особенности ^{14}C -метода обсуждались во многих работах. Последовательность операций, расчет необходимых поправок, приготовление рабочих растворов, техника счета на радиоизмерительной аппаратуре – все это можно найти в специальных методических руководствах по методике измерения первичной продукции (Романенко, Кузнецов, 1974; Хромов, Семин, 1975; Федоров, 1979).

Достоинство ^{14}C -метода – высокая чувствительность (почти на два порядка выше кислородного метода), благодаря которой он стал незаменим при изучении первичной продукции в олиготрофных водоемах. Из недостатков радиоуглеродного метода можно выделить следующие.

Связывание организмами изотопа в виде бикарбонатов может быть результатом различных процессов, среди которых не все имеют отношение к фотосинтезу. Включение ^{14}C в органическое вещество может быть результатом темновой реакции (гетеротрофной ассимиляции) (Романенко, Кузнецов, 1979). Есть еще много специфических проблем, связанных с использованием радиоактивного минерального углерода, обсуждение которых выходит за рамки настоящего издания.

Склянки с радиоактивным углеродом (светлые и темные) экспонируют *in situ* в течение 4-8 часов. Однако некоторые авторы (Федоров, 1979) рекомендуют проводить краткосрочные опыты (не более 4 ч), так как длительная экспозиция ведет к увеличению методических погрешностей.

После окончания экспозиции продукционные склянки (особенно поднятые с больших глубин) следует сразу же поместить в темный ящик для предотвращения дальнейшего фотосинтеза. Если же существует необходимость обработки живого материала, его фильтрацию следует вести в затененных условиях.

Пробы фиксируют 1 мл 4%-ного раствора формальдегида. Содержимое каждой склянки фильтруют через мембранные фильтры с размерами пор 0,2 или 1,5 мкм. Фильтрацию проб необходимо осуществлять при разрежении не более 0,3-0,5 атм., чтобы не повредить клетки. Фильтры подписывают и высушивают.

Для удаления адсорбированных на поверхности фильтров меченых карбонатов их помещают на фильтровальную бумагу, смоченную 0,5%-ным раствором соляной кислоты. После 5 мин обработки фильтры раскладывают на фильтровальной бумаге, смоченной дистиллированной водой, для удаления избытка соляной кислоты и высушивают. Согласно другой рекомендации фильтры располагают в кювете с 0,5%-ным раствором соляной кислоты в плавучем состоянии (Романенко, Кузнецов, 1974).

В дальнейшем осуществляют подсчет радиоактивности фильтров (с осадком) на счетчике (торцовом Гейгера-Мюллера или жидкостном сцинтилляционном). В настоящее время широко используются жидкостные сцинтилляционные счетчики, которые значительно упрощают процедуру подсчета радиоактивных фильтров.

Для расчета первичной продукции под 1 м² поверхности водоема измеряют скорость фотосинтеза планктона на нескольких горизонтах фотической зоны. При выборе горизонтов следует ориентироваться на прозрачность воды по диску Секки. Например, отбирают пробы с поверхности водоема и с глубин, равных 0,25S, 0,5S, S, 1,5S, 2S, 2,5S, 3S, где S – прозрачность воды по диску Секки.

Диск Секки представляет собой прикрепленный к тросу диск белого цвета (диаметр 30 см). Прозрачность «по диску Секки» – граница его видимости в толще воды.

Однако утроенная прозрачность воды является лишь ориентировочным показателем толщины фотического слоя, который может быть использован для водоемов умеренных широт, где фотосинтез прослеживается до 3-3,5S (при использовании ^{14}C -метода). Другие исследователи считают, что за нижнюю границу фотической зоны можно принимать глубину проникновения 1% солнечной радиации, падающей на поверхность водоема.

Производство фитопланктона в водоемах, естественно, зависит от скорости фотосинтеза, которая в значительной степени определяется световыми условиями. С глубиной освещенность уменьшается, а, соответственно, уменьшается и скорость фотосинтеза.

Максимальная скорость фотосинтеза в единице объема воды в озерах высоких широт (в более южных при пасмурной погоде) наблюдается обычно вблизи поверхности. В водоемах умеренных широт фотосинтез у поверхности нередко угнетается избыточной солнечной радиацией и максимум фотосинтеза регистрируется на некоторой глубине. Например, для многих озер максимум фотосинтеза наблюдается на глубине 0,1-0,25 или 0,5 м, причем здесь он в 3-6 раз выше, чем в самом верхнем слое воды (Романенко, Даукшта, 1969). На это необходимо обращать внимание при выборе горизонтов отбора проб фитопланктона и экспонирования склянок при определении его продукции.

К важнейшим показателям первичной продукции, измеренной с помощью кислородного или радиоуглеродного методов, является:

1. Суточный фотосинтез под 1 м² поверхности водоема;
2. Сезонная (или годовая) продукция фитопланктона.

Первичную продукцию чаще всего измеряют в течение вегетационного сезона с интервалом в 5-10 дней. Когда известна продукция в отдельные моменты времени, интегральную продукцию за вегетационный сезон определяют с помощью простейшего метода трапеций. Значения продукции в отдельные даты наблюдений наносят на график и соединяют ломаной линией. Затем находят площадь фигуры (трапеции), ограниченной осью абсцисс и ломаной линией. Продукция в течение вегетационного сезона (лета или года) находят суммированием площадей отдельных

трапеций (Алимов, 1989).

Расчет продукции под 1 м^2 поверхности водоема находят следующим образом. На график наносят значения продукции фитопланктона на разных горизонтах водоема и соединяют их линиями. Площадь фигур (трапеций) рассчитывают с помощью метода трапеций, сторонами которых в данном случае являются значения первичной продукции на последовательных горизонтах, а основаниями – расстояние (в метрах) между соответствующими глубинами, на которых велись наблюдения скорости фотосинтеза планктона (Алимов, 1989).

Среди исследований продукции фитопланктона можно выделить детальные наблюдения, проведенные на протяжении одного или нескольких сезонов, которые позволяют рассчитать годовые величины первичной продукции.

При рассмотрении годовых величин первичной продукции в разных водоемах (выраженных в одних единицах) наблюдаются следующие особенности (Бульон, 1983).

1. Продукция фитопланктона в одном и том же водоеме в разные годы может сильно различаться. Например, в Рыбинском водохранилище ее значения изменяются от 29 до 185 г С/м^2 год, в озере Красное – 62-120; в Байкале – $70\text{-}165 \text{ г С/м}^2$ год.

2. Продукция фитопланктона закономерно возрастает от северных водоемов к южным, более чем в 300 раз. Здесь имеется в виду возрастание верхнего предела первичной продукции водоемов, поскольку олиготрофные озера встречаются в равной мере как на севере, так и на юге.

Анализ величин первичной продукции пресных водоемов мира от Арктики до тропиков (по материалам Международной биологической программы - для 43 озер и 12 водохранилищ) показал, что годовая продукция изменяется от 3 до 1100 г С/м^2 в год, т.е. в 400 раз (Brylinsky, Mann, 1973).

ХЛОРОФИЛЬНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ ПРОДУКЦИИ

Впервые содержание хлорофилла было определено Е.М.Крепсом и Н.А.Вержбицкой в 1930 г. при изучении фитопланктона Баренцева моря (Алимов,

1989). В настоящее время определение содержания хлорофилла в планктоне широко используется в гидробиологической практике. Измерение концентрации хлорофилла позволяет не только получать сведения о биомассе водорослей, но и примерно оценить их фотосинтетическую активность.

Существует определенная связь между количеством пигментов фитопланктона и скоростью образования органического вещества (то есть, величиной его продукции). Для расчета первичной продукции по содержанию в водорослях хлорофилла *a* необходимо знать так называемое ассимиляционное число хлорофилла (АЧ). Это число показывает, какое количество углерода углекислоты ассимилируется в единицу времени одной весовой единицей хлорофилла в процессе фотосинтеза при световом насыщении. Обычно АЧ выражают в мг С/мг хлорофилла *a* за сутки или 1 час.

Максимальные значения АЧ для озер разных широт находятся в пределах 1-10 мг С/(мг ч) или 3,3-33 мг кислорода/(мг ч). А содержание хлорофилла *a* (мг/м³) в озерах и водохранилищах находится в следующих пределах: олиготрофные – 1; мезотрофные – 1-10; эвтрофные – 10-100; высокотрофные – 100 и более.

Поэтому, зная АЧ и концентрацию хлорофилла в воде, можно ориентировочно судить о величине первичной продукции в водоеме.

Помимо сведений об АЧ и концентрации хлорофилла для определения продукции необходимо знать зависимость интенсивности фотосинтеза от световых условий и распределение энергии радиации по глубинам, что позволяет рассчитать распределение относительных величин фотосинтеза R_z . Величина R_z находится по графику (рис.14), где представлены величины соотношения между общей дневной радиацией, падающей на поверхность, и дневным относительным фотосинтезом (R_z), на поверхности и на глубинах, где интенсивность света составляет соответствующий процент (до 50, 25, 10 и 1%) от величины падающей радиации (Винберг, 1960; Федоров, 1979).

Относительный фотосинтез R_z на графике отмечен для глубин, где световая радиация уменьшается (до 50, 25, 10 и 1%) от величины, падающей на поверхность воды, радиации.

Зная величину падающей радиации за день, концентрацию хлорофилла *a* на

определенной глубине (C_z) и найдя по графику величину R_z , можно рассчитать продукцию фитопланктона (P_{RC}) по формуле:

$$P_{RC} \text{ (мг/м}^3\text{)} = R_z C_z 3,7,$$

где: 3,7 – рекомендуемое для расчетов ассимиляционное число;

R_z - относительный фотосинтез на глубине z для соответствующего значения поверхностной радиации;

C_z - концентрация хлорофилла a (мг/ м³) на глубине z ;

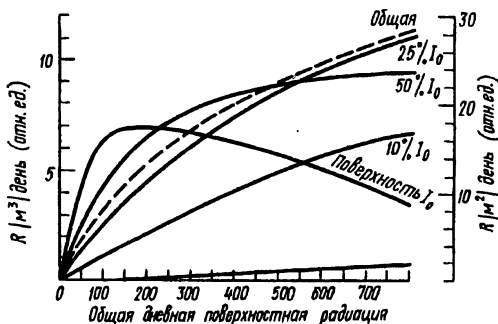


Рис. 14. Соотношение между общей дневной радиацией, падающей на поверхность, и дневным относительным фотосинтезом (R_z) на поверхности и на глубинах, где интенсивность света составляет соответствующий коэффициент падающей радиации

Результаты, получаемые с использованием хлорофильного метода, являются вполне приемлемыми в гидробиологических исследованиях. Однако они могут рассматриваться лишь в качестве ориентировочных значений, дополнением к величинам первичной продукции, полученным скляночными методами.

Поэтому специалисты рекомендуют использовать хлорофильный способ оценки первичной продукции, когда измерение скляночным методом по каким-либо причинам невозможно.

ПРИЖИЗНЕННОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ РАСТВОРЕННОГО ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА ВОДОРОСЛЯМИ

Установлено, что водоросли (в том числе и природный фитопланктон) прижизненно выделяют в среду растворенное органическое вещество (РОВ), величины которых бывают довольно существенными. Причем в большинстве случаев прижизненные выделения являются функцией здоровых клеток водорослей.

Природный фитопланктон и культуры водорослей способны экскретировать в среду до 50% и более включенного при фотосинтезе углерода. В связи с этим становится совершенно очевидным необходимость их количественного изучения; недоучет приводит к неверным величинам первичной продукции водоемов.

Прижизненные выделения водорослей продуктов фотосинтеза называют **внеклеточной, или экстрацеллюлярной, продукцией**. Внеклеточная продукция фитопланктона – это в основном низкомолекулярные и легкоусвояемые продукты, которые хорошо утилизируются не только бактериями, но и самими же водорослями (Садчиков, 1997).

Стандартным ^{14}C -методом невозможно учесть растворенные продукты фотосинтеза, так как этот метод регистрирует только внутриклеточную продукцию водорослей, то есть, радиоактивную метку, которая находится внутри клеток, отфильтрованных на мембранных фильтрах. Меченое по ^{14}C РОВ при фильтрации проходит через фильтры и оказывается в фильтрате. Однако в процессе фильтрации водорослей иногда происходит повреждение клеток, в результате чего часть их содержимого поступает в фильтрат. Этот артефакт создает видимость интенсивного выделения водорослями РОВ, что опять же сказывается на результатах исследований. Ошибка в оценке продукции фитопланктона морских и пресных водоемов за счет потерь РОВ при фильтрации может достигать 30-50% и более (Бульон, 1983; Алимов, 1989).

Необходимо отметить, что среди исследователей нет единого мнения о сущности экстрацеллюлярных продуктов. Большинство исследователей связывают потери ассимилированного углерода с прижизненными выделениями клетками водорослей во внешнюю среду продуктов фотосинтеза. В этом случае речь идет об

истинной внеклеточной продукции фитопланктона. По мнению других исследователей, потери возникают в результате разрушения меченых клеток на фильтре в процессе фильтрации или они обусловлены пассивным выделением органического вещества отмирающими клетками фитопланктона.

Детальные наблюдения над скоростью экскреции органического вещества в мезотрофном озере Уиндермир (Англия) показали, что количество выделенного РОВ составило 10-30% общего ассимилированного углерода, а иногда 95%. Экстрацеллярная продукция была обнаружена на всех глубинах фотической зоны. Исследователи отмечали, что отсутствие данных по внеклеточной продукции приводит к недооценке первичной продукции приблизительно на 30% (Бульон, 1983). В Можайском водохранилище в среднем за сезон экскретировалось 15% включенного при фотосинтезе меченого углерода; максимальные значения достигали 80% (Садчиков, Макаров, Максимов, 1995; Садчиков, Макаров, 1997; Садчиков, 1997)

Данных по внеклеточной продукции морского фитопланктона значительно больше, чем для пресноводного. Это объясняется в первую очередь тем, что в практике морских исследований радиоуглеродный метод распространен значительно шире, чем в пресноводной гидробиологии. В морях и океанах фитопланктон экскретирует в среду от 5 до 50% ассимилированного меченого углерода.

Внеклеточная продукция фитопланктона в олиготрофных водоемах может быть соизмерима с внутриклеточной продукцией водорослей.

В экспериментах с культурами пресноводного и морского фитопланктона обнаруживались низкие значения экстрацеллярной продукции по сравнению с данными для природных популяций – до 5%, что связано высокими концентрациями клеток водорослей и РОВ в культурах.

Экскреция РОВ зависит от плотности популяции фитопланктона; повышение плотности культур приводило к снижению фотосинтеза и увеличению экскреции. По мнению специалистов (Nalewajko, 1966) это связано с истощением запасов питательных веществ и самозатенением клеток.

Изучению прижизненного выделения РОВ фитопланктоном в последнее

время уделяется большое внимание, так как количество этих выделений порой бывает довольно существенным. В тоже время методические аспекты изучения этого явления разработаны слабо; в основном описаны методы, позволяющие производить подсчет метки под торцовым счетчиком (Федоров, 1979; Бульон, 1983).

В последнее время для этих целей используют сцинтилляционные счетчики, которые повышают точность подсчета образцов и в какой-то степени упрощают методику эксперимента. К настоящему времени разработан ряд методов, применение которых позволяет учитывать внеклеточную продукцию фитопланктона (Садчиков, Френкель, 1990; Садчиков, Макаров, 1997).

На результаты исследований оказывают влияние ряд факторов, которые мы и попытаемся осветить в данном разделе.

При расчете количества добавленной метки ($\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$) в продукционную склянку необходимо исходить из характера эксперимента и возможностей используемого сцинтилляционного счетчика.

Для достоверного подсчета меченого РОВ необходимо, чтобы в пробе (сцинтилляционном флаконе) при подсчете было не менее нескольких сот импульсов на 1 мл. В связи с тем, что водоросли выделяют в среду от долей процента до нескольких десятков процентов от первичной продукции и в то же время потребляют 30-80% от внесенной метки, необходимо при изучении прижизненного выделения РОВ вносить в продукционную склянку метку активностью не менее 100-200 тыс имп./мин, что значительно меньше, чем при работе с торцовыми счетчиками (Садчиков, Френкель, 1990). В некоторых экспериментах можно обходиться и меньшим количеством добавленной метки (Садчиков, Макаров, Максимов, 1995). При меньшем количестве внесенной метки можно не уловить выделенное водорослями РОВ, а при слишком большом – расходуется дорогой реактив.

При внесении метки в склянку чаще всего используются автоматические дозаторы, однако они достаточно часто грешат сбоями; их время от времени необходимо калибровать.

При проведении исследований чаще всего используют расчетный метод определения активности метки исходя из паспортных данных фабричной упаковки или в продукционную склянку вносят разбавленный раствор $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ с заранее

известной активностью (Бульон, 1983; Романенко, Кузнецов, 1974). Однако существует и третий, менее распространенный метод – определение активности метки после ее внесения в продукционную склянку. В этом случае в склянку добавляют метку, осторожно перемешивают ее и через 1-2 мин отбирают аликвоту (1 мл) для подсчета в счетчике. Здесь идет корректировка на разбавление при использовании разных объемов продукционных склянок, возможных потерь при внесении метки и др. Этот способ позволяет учесть истинную активность внесенной метки в продукционную склянку. Метку желательно вносить в один объем пробы и после тщательного ее перемешивания делить на подпробы, т.е., разливать в светлые и темные склянки. Эту процедуру необходимо проводить в темноте.

При работах по определению прижизненного выделения РОВ длительное экспонирование проб (более 4 ч) неприемлемо. Экспозиция должна быть достаточной для того, чтобы можно было зарегистрировать достоверное его количество и в то же время такой, чтобы микроорганизмы не успели его «выесть». Проведенные эксперименты показали, что для этой цели вполне достаточно 4 ч (Садчиков, Френкель, 1990).

Фильтрация воды является одной из наиболее важных процедур опыта, так как «жесткая» фильтрация может повреждать водоросли и в фильтрат попадает содержимое разрушенных клеток. Опыты показали, что фильтровать необходимо при разрежении не более 0,3 атм., что должно строго контролироваться (особенно при работе с несколькими фильтровальными воронками). Чтобы снизить вероятность разрушения водорослей, необходимо фильтровать небольшие порции воды (не более 20 мл) и чаще менять фильтр.

При фильтрации необходимо строго контролировать прохождение меченых бактерий через мембранные фильтры; они вместе с РОВ регистрируются в сцинтилляционном флаконе и дают неверные результаты. Это связано с тем, что при фильтрации проб через мембранные фильтры с порами размером 0,2 мкм иногда наблюдается прохождение через них бактерий.

После фильтрации в фильтрате остается неиспользованный водорослями меченый бикарбонат натрия. Это связано с тем, что водоросли при фотосинтезе

утилизируют только 30-80% внесенной метки (Садчиков, Френкель, 1990). От него необходимо избавиться.

Реальные величины прижизненного выделения РОВ водорослями во многом будут зависеть от степени очистки пробы от оставшегося $\text{NaN}^{14}\text{CO}_3$. Для этого пробу (фильтрат) подкисляют до pH 2,8-3,0, и затем продувают ее воздухом с интенсивностью около 150-200 мл/мин в течение 30 мин. Барботация пробы углекислым газом дает несколько лучшие результаты, чем барботация воздухом.

После барботации показатель pH доводят концентрированной NaOH до исходного, затем 1 мл пробы помещают в сцинтилляционный флакон для последующего просчета в сцинтилляционном счетчике. Следует отметить, при подкислении и нейтрализации пробы приходится пересчитывать результаты за счет ее разбавления кислотой и щелочью.

При проведении экспериментов, особенно в полевых условиях, не всегда удается сразу же просчитать на счетчике пробы с меченым РОВ. Достаточно длительное хранение пробы (до 15 суток) возможно в замороженном виде; потери при 8-дневном хранении не превышали 2-4%, а при 15-дневном - 3-5%. Наиболее удобно хранить меченое РОВ в сцинтилляционном флаконе с ЖС-50 (или с другим сцинтиллятором), однако необходимо иметь в виду, что последний легко «испаряется» даже при плотно закрытых крышках пластмассовых одноразовых флаконов, а объем его оказывает влияние на результат счета.

Нефиксированные пробы РОВ при комнатной температуре можно хранить не более 3 суток – при этом теряется около 7-8% метки; в дальнейшем потери резко возрастают – на 8-й день – 44%, а на 15-й – 56%.

ЛИТЕРАТУРА

- Алекин О.А. Химический анализ вод суши. - Л., Гидрометеиздат, 1954.
- Алимов А.Ф. Введение в продукционную гидробиологию. - Л., Гидрометеиздат, 1989.
- Бажанова Н.В. и др. Пигменты пластид зеленых растений и методика их исследования - М.-Л., Наука, 1964.
- Бульон В.В. Первичная продукция планктона внутренних водоемов. - Л., Наука, 1983.
- Вассер С.П., Кондратьева Н.В., Масюк Н.П. и др. Водоросли. Справочник. - Киев, Наукова Думка, 1989.
- Винберг Г.Г. Первичная продукция водоемов. - Минск, Изд-во АН БССР, 1960.
- Винберг Г.Г. Успехи лимнологии и гидробиологические методы контроля качества вод по гидробиологическим показателям. - Тр. Всесоюзн. конф., Москва, 1-3 ноября 1978 г.- Л., Гидрометеиздат, 1981.
- Виноградова Л.А. Экспериментальное определение скорости гравитационного опускания морских планктонных водорослей. - Океанология, 1977, т. 17, № 4.
- Горюнова С.В. Техника применения метода люминесцентной микроскопии для гидробиологических исследований. - В кн. "Жизнь пресных вод СССР", т. 4, ч. 1, М.-Л., Изд-во АН СССР, 1956.
- Громов Б.В. Коллекция культур водорослей ЛГУ. - Тр. Петергофского биол. ин-та ЛГУ, 1965, т. 19.
- Гусева К.А. Методы эколого-физиологического исследования водорослей. - В кн. "Жизнь пресных вод СССР", т. 4, ч.1. - М.-Л., Изд-во АН СССР, 1956.
- Девяткин В.Г. Структура и продуктивность литоральных альгоценозов водохранилищ верхней Волги. - Автореф. докт. дисс., М.: МГУ, 2003.
- Киселев И.А. Методы исследования планктона. - В кн. "Жизнь пресных вод СССР", т.4, ч. 1, М.-Л., Изд-во АН СССР, 1956.
- Киселев И.А. Планктон морей и континентальных водоемов. - Л., Наука, т.1, 1969.
- Киселев И.А. Планктон морей и континентальных водоемов. - Л., Наука, т. 2, 1980.
- Клейн Р.М., Клейн Д.Т. Методы исследования растений. - М., Колос, 1974.
- Кожова О.М. О подледном "цветении" озера Байкал. - Ботан. журн., 1959, т. 44, № 7.
- Кольцова Т.И. и др. К вопросу о представительности выборок при анализе фитопланктонных проб. - Гидробиол. журн., 1971, т. 7, № 3.
- Константинов А.С. Использование теории множеств в биогеографическом и экологическом анализе. - Успехи соврем. биол., 1969, т. 67, № 1.

- Кузьмин Г.В. Фитопланктон Шекснинского водохранилища и сопредельной ему акватории Рыбинского водохранилища. – Автореф. канд. дисс., Л., 1971.
- Кузьмин Г.В. Фитопланктон. Видовой состав и обилие.- В кн. “Методы изучения биогеоценозов внутренних водоемов”. – М., Наука, 1975.
- Кузьмин Г.В., Елизарова В.А. Фитопланктон Рыбинского водохранилища в 1963-1965 гг. – Труды ИБВВ АН СССР, вып. 15(18), 1967.
- Кузнецов С.И., Дубинина Г.А. Методы изучения водных микроорганизмов. – М., Наука, 1989.
- Левич А.П., Булгаков Н.Г., Замолотчиков Д.Г. Оптимизация структуры кормовых фитопланктонных сообществ. – М.: КМК Scientific Press Ltd., 1996.
- Левич А.П., Максимов В.Н., Булгаков Н.Г. Теоретическая и экспериментальная экология фитопланктона. Управление структурой и функциями сообществ. – М.: Изд-во НИЛ, 1997.
- Макрушин А.В. Биологический анализ качества вод. – Л., ЗИН АН СССР, 1974.
- Меницкая И.М. Извлечение пигментов из синезеленых водорослей с помощью микропорошков синтетических алмазов. - Синтетические алмазы, 1970, № 2/8.
- Методика биологических исследований по водной токсикологии. – М., Наука, 1971.
- Методика изучения биогеоценозов внутренних водоемов – М., Наука, 1975.
- Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике.- Киев, Наукова Думка, 1975.
- Михеева Т.М. Сукцессия видов в фитопланктоне: определяющие факторы. - Минск, Изд-во БГУ, 1983.
- Николаев И.И. Планктонные водоросли. – В кн. “Жизнь растений”. – М., Просвещение, 1977, т. 3.
- Одум Ю. Основы экологии. – М., Мир, 1975.
- Осетров В.И. О применении цитохимических методов при изучении жизненной активности синезеленых водорослей. – В кн. “Цветение воды”, Киев, Наукова Думка, 1968.
- Поповская Г.И., Вотинцев К.К. Продукция Байкальских перидиней. – ДАН СССР, 1967, т. 172, № 5.
- Пырина И.Л. Первичная продукция фитопланктона. - В кн. “Методы изучения биогеоценозов внутренних водоемов. – М., Наука, 1975.
- Романенко В.И., Кузнецов С.И. Экология микроорганизмов пресных водоемов. Лабораторное руководство – Л., Наука, 1974.
- Руководство по химическому анализу вод суши. - Л., Гидрометеониздат, 1973.

- Руководство по гидробиологическому мониторингу пресноводных экосистем (под ред. Абакумова В.А.). – Санкт-Петербург, Гидрометеонздат, 1992.
- Садчиков А.П. Продуцирование и трансформация органического вещества размерными группами фито- и бактериопланктона. – Автореф. докт. дисс., М., МГУ, 1997.
- Садчиков А.П., Козлов О.В. Начала альгологии: лекции по экологии водорослей. – М., Диалог-МГУ, 1996.
- Садчиков А.П., Макаров А.А. Методические аспекты изучения прижизненных выделений водорослей в природных водоемах. - Гидробиол. журн., 1996, т. 32, № 5.
- Садчиков А.П., Макаров А.А., Максимов В.Н. Продукция размерных групп фитопланктона в водоемах разной трофности. - Гидробиол. журн., 1995, т. 31, № 6.
- Садчиков А.П., Френкель О.А. Прижизненное выделение растворенного органического вещества фитопланктоном (методические аспекты). – Гидробиол. журн., 1990, т. 26, № 1.
- Сапожников Д.И. Пигменты пластид зеленых растений и методика их исследования. – М.-Л., Наука, 1964.
- Саут Р., Уиттик А. Основы альгологии. – М., Мир, 1990.
- Сиренко Л.А. К методике культивирования синезеленых водорослей – возбудителей “цветения” воды. – В кн. “Цветение воды”. – Киев, Наукова Думка, 1968.
- Сиренко Л.А. Физиологические основы размножения синезеленых водорослей в водохранилищах. - Киев, Наукова Думка, 1972.
- Сиренко Л.А. Некоторые итоги альгофизиологических исследований в Институте гидробиологии АН УССР. – В кн. “Проблемы гидробиологии и альгологии”. – Киев, Наукова Думка, 1978.
- Сиренко Л.А., Кокырца П.Н. Суточная вертикальная миграция *Microcystis aeruginosa* и ее влияние на содержание азотистых компонентов в клетках. – Гидробиол. журн, 1981, т. 17, № 2.
- Сиренко Л.А., Сакевич А.И., Осипов Л.Ф. и др. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей и гидробиологической практике. – Киев, Наукова Думка, 1975.
- Сорокин Ю.И. Определение поправочных коэффициентов на самопоглощение излучения ¹⁴C при определении продукции фотосинтеза и хемосинтеза в водоемах. – Микробиология, 1962, т. 31, № 1.
- Сорокин Ю.И. О применении радиоактивного углерода для изучения питания и пищевых связей водных животных. – Труды ИБВВ АН СССР, вып. 12 (15), 1966.
- Сорокин Ю.И. Первичная продукция морей и океанов. – В кн. “Общая экология. Биоценология. Гидробиология.” М., ВИНТИ, 1973, т. 1.

- Строганов Н.С., Бузинова Н.С. Гидрохимия. – М., Изд-во МГУ, 1969.
- Топачевский А.В., Масюк Н.П. Пресноводные водоросли Украинской ССР. - Киев, Вища школа, 1984.
- Трифорова И.С. Состав и продуктивность фитопланктона разнотипных озер Карельского перешейка. – Л., Наука, 1979.
- Трифорова И.С. Экология и сукцессия озерного фитопланктона. – Л., Наука, 1990.
- Трифорова И.С. Сезонная и основная сукцессия озерного фитопланктона. – Гидробиол. журн., 1986, т. 22, № 3.
- Унифицированные методы исследования качества вод. Часть 3. Методы биологического анализа вод. – М.: Изд-во СЭВ, 1976.
- Успенская В.И. Экология и физиология питания пресноводных водорослей. – М., Изд-во МГУ, 1966.
- Федоров В.Д. О корреляции между биомассой особи и предельной численностью популяций в фитопланктонном сообществе. – ДАН АН СССР, 1969, т. 188, № 3.
- Федоров В.Д. Особенности организации биологических систем и гипотеза “вспышки” вида в сообществе. – Вестник МГУ, Сер. Биол., 1970, № 2.
- Федоров В.Д. О методах изучения планктона и его активности. – М., Изд-во МГУ, 1979.
- Федоров В.Д. и др. Некоторые итоги изучения первичной продукции фитопланктона Белого моря. – Гидробиол. журн., 1974, т. 10, № 5.
- Финенко З.З. Эколого-физиологические основы первичной продукции в море. – Автореф. докт. дисс., М., 1976.
- Хромов В.М., Семин В.А. Методы определения первичной продукции в водоемах. – М., Изд-во МГУ, 1975.
- Ahlgren G. Lake Norrviken, a eutrophicated Swedish Lake; Phytoplankton and its production. – Schweiz.Zeitschr. Hydrol. 1970, Bd 32, N 2.
- Ahlgren G. Response of phytoplankton and primary production to reduced nutrient loading in lake Norrviken. – Verh. Intern. Vereinig. Theor. And angew. Limnol. 1978, vol. 20.
- Bailey-Watts A. A nine-year study of the phytoplankton of the eutrophic and non-stratifying Loch Leven (Kinross, Scotland). - J. Ecol. 1978, vol. 66.
- Brylinsky M., Mann K.H. An analysis of factors governing productivity in lakes and reservoirs. - Limnol. Oceanogr. 1973, v. 18, N 1.
- Edmondson W.T. Eutrophication in North America. – Eutrophication, causes, consequences, correctives. - Washington, 1969.
- Fogg G.E Algal cultures and phytoplankton ecology. - London, 1965.

- Goldman C., Amezaga E. Spatial and temporal changes in the primary productivity of lake Tahoe, California-Nevada between 1959 and 1971. - Verh. Intern. Vereinig. Theor. And angew. Limnol. 1975, vol. 19.
- Hegewald E. et al. Okologische und physiologische Studien an Planktonalgen aus ungarischen Gewassern. - Arch. Hydrobiol., 1981, vol.60, N 2.
- Hindak F., Trifonova I. Morphology and ecology of three Limnotherix species (Cyanophyta) from the Hipolimnion of a highly eutrophic lake in Latvia, USSR. - Biologia (Bratislava), 1989, N 1.
- Jones J.R., Bachmann R.W. Algal response to nutrient inputs in some Iowa lakes. - Verh. Intern. Vereinig. Limnol., Stuttgart, 1975, vol. 19.
- Kilham S.S. et al. Phosphate and silicate kinetics for the Lake Michigan diatom *Diatoma elongatum*. - J. Great Lakes Res., 1977, vol. 3, N 1-2.
- Munawar M., Munawar I. Phytoplankton of lake Superior, 1973. - J. Great Lakes Res., 1978, vol. 4, N 3-4.
- Munawar M., Munawar I. The seasonality of phytoplankton in the North American Great Lakes a comparative synthesis. - Hydrobiologia, 1986, vol. 138.
- Nalewajko C. Photosynthesis and excretion in various planktonic algae. - Limnol. Oceanogr. 1966, vol. 11, N 1.
- Reynolds C.S. The ecology of freshwater phytoplankton. - Cambridge, 1984.
- Skulberg O.M. Some observations on red-coloured species of *Oscillatoria* in nutrient-enriched lakes of southern Norway. - Verh. Intern. Vereinig. Limnol., Stuttgart, 1978, vol. 20, N 2.
- Skulberg O.M. Blue-green algae in lake Mjosa and other Norwegian lakes. - Progr. Water Technol. 1980, vol. 12.
- Stemann Nielsen E. The use of radio-active carbon (^{14}C) for measuring organic production in the sea. - J. Con. Perm. Int. Explor Mer. 1952, v. 18.
- Stoermer E. Phytoplankton assemblages as indicators of water quality in Laurentian Great Lakes. - Trans. Amer. Microsc. Soc. 1978, vol. 97.
- Strickland J.D.H., Parsons T.R. A practical handbook of seawater analysis. - Fish. Res. Board of Can., 1969, v. 167.
- Tilman D. Resource competition between planktonic algae; an experimental and theoretical approach. - Ecology, 1977, vol. 58.
- Tilman D. et al. Green, bluegreen and diatom algae; Taxonomic differences in competitive ability for phosphorus, silicon and nitrogen. - Arch. Hydrobiol., 1986, Bd 106, N 4.

**ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
ВОДОРОСЛЕЙ**

Среда Кнопа (г/л, применяется в разведениях 1/2, 1/4, 1/10 для зеленых водорослей):

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 - 0,25$

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,06$

$\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0,06$

$\text{KCl} - 0,08$

$\text{Fe}_2\text{Cl}_6 - 1$ капля 1%-ного раствора

Среда Прата (г/л, для зеленых водорослей и хранения коллекции культур):

$\text{KNO}_3 - 0,10$

$\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0,01$

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,01$

Агар-агар - 1,2%

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,001$

Среда Тамия (г/л, применяется в разведениях для зеленых водорослей):

$\text{KNO}_3 - 5,0$

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 2,50$

$\text{K}_2\text{HPO}_4 - 1,25$

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,003$

Раствор микроэлементов* - 1 мл ЭДТА - 0,037

Среда Чу-10 (г/л, для синезеленых, зеленых и диатомовых водорослей):

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 - 0,04$

$\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0,01$

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,025$

$\text{Na}_2\text{CO}_3 - 0,02$

$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O} - 0,025$

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,0008$

Среда Бенке (г/л, для синезеленых азотфиксирующих водорослей):

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,1$

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 - 0,5$

$\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0,2$

Железо лимоннокислое - 0,0033

Лимонная кислота - 0,0033

Среда Бенеке (г/л, для зеленых, синезеленых неазотфиксирующих водорослей):

NH_4NO_3 – 0,2

CaCl_2 – 0,1

K_2HPO_4 – 0,1

MgSO_4 – 0,1

Fe_2Cl_6 – следы (1 капля 1%-го раствора)

Среда Горюшовой (г/л, на водопроводной воде, для синезеленых, представителей рода *Oscillatoria*):

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – 0,5

KH_2PO_4 – 0,3

MgCl_2 – 0,1

FeSO_4 – 0,01

Любая соль молибдена – следы

Любая соль ванадия – следы

Среда Ягужинского (г/л, для зеленых водорослей):

KNO_3 – 0,5

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1

Na_2HPO_4 – 0,2

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 2 мг/л

Среда Фогта (г/л, pH 8,2, для синезеленых азотфиксирующих водорослей):

K_2HPO_4 – 0,2

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,116

NaHCO_3 – 0,2

Раствор Гвидака (г/л, применяется в разведении 1/4 и 1/8 для интенсивного культивирования водорослей):

$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ – 3,0

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,3

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 5,0

KH_2PO_4 – 2,5

H_3BO_3 – 0,06

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,04

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,04

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,025

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,006$

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - 0,005$

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,008$

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,002$

ЭДТА – 0,35

Среда Громова (для большинства водорослей):

$\text{KNO}_3 - 0,1 \text{ г/л}$

$\text{K}_2\text{HPO}_4 - 66,7 \text{ мг/л}$

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 33,3 \text{ мг/л}$

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,022 \text{ мг/л}$

$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 1,81 \text{ мг/л}$

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,079 \text{ мг/л}$

$\text{NaVO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 2,63 \text{ мг/л}$

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 1 \text{ мг/л}$

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 9,3 \text{ мг/л}$

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - 1,2 \text{ мг/л}$

$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O} - 0,02 \text{ мг/л}$

ЭДТА – 10 мг/л

Агар-агар – 1,5%

***Раствор микроэлементов: $\text{H}_3\text{BO}_3 - 2,86 \text{ г/л}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 1,81 \text{ г/л}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,2$**

$\text{MoO}_3 - 176,4 \text{ мг/10 л}$, $\text{NH}_4\text{VO}_3 - 229,6 \text{ мг/10 л}$.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ВИДОВ ВОДОРОСЛЕЙ-ИНДИКАТОРОВ САПРОБНОСТИ
 (список видов водорослей взят из книги "Унифицированные методы исследования качества вод. Часть 3. Методы биологического анализа вод. Приложение 2. Атлас сапробных организмов. – М.: Изд-во СЭВ, 1977)

1. ПОЛИСАПРОБЫ

Cyanophyta

Oscillatoria chlorina (Kütz.) Gomont

O. putrida Schm.

Pseudanabaena catenata Laut.

P. constricta (Szaf.) Laut.

Spirulina jenniferi (Stiz.) Geitler

Euglenophyta

Euglena caudata Hubn.

E. deses Ehr.

E. geniculata Duj.

E. proxima Dang.

Chlorophyta

*Chlorella vulgaris** Beij.

*Chlorogonium euchlorum** Klebs

*Gonium pectorale** Mull.

*также α -мезосапробы

2. α -МЕЗОСАПРОБЫ

Cyanophyta

*Aphanizomenon flos-aquae** (L.) Ralfs

Arthospira major Kütz.

Oscillatoria brevis Kütz.

O. chalybea (Mert.) Gomont

O. formosa Bory

O. fragilis Boch.

*O. limosa** Ag.

O. princeps Vauch.

O. splendida Grev.

O. subtilissima Kütz.

O. tenuis Ag.

*Phormidium automnale** (Ag.) Gomont

*Ph. uncinatum** (Ag.) Gomont

*также β-мезосапробы

Diatomeae

Cyclotella meneghiniana Kütz.

Cymatopleura solea var. *apiculata* (W. Sm.) Ralfs

C. solea (Breb.) W. Sm.

Hantzschia amphioxys (Ehr.) Grun.

Navicula cryptocephala Kütz.

*N. cuspidata** Kütz.

N. rhynchocephala Kütz.

N. viridula Kütz.

Nitzschia acicularis (Kütz.) W. Sm.

N. palea (Kütz.) W. Sm.

Stephanodiscus hantzschii Grun.

*также β-мезосапробы

Cryptophyta

*Chroomonas caudata** Geitl.

*Ch. pulex** Pash.

Cryptomonas erosa Ehr.

C. ovata Ehr.

*также β-мезосапробы

Dinophyta

Amphidinium larvale Lind.

Gyrodinium hyalinum (Schill.) Kof. Et Swezy

G. hantzschii Uter.

Katodinium piacinale Fott.

*K. vorticella** (Stein) Fott

*также β-мезосапробы

Euglenophyta

Colacium cyclopicola (Gickl.) Bourr.

C. sideropus Skuja

*Euglena acus** Ehr.

E. pisciformis Klebs

E. splendens Dang.

*E. variabilis** Klebs

*E. velata** Klebs

*Lepocinclis ovum** (Ehr.) Lemm.

L. texta (Duj.) Lemm.

Phacus acnigmaticus Drezh.

*Ph. acuminatus** Stok.

Ph. brachykentron Pochm.

Ph. longicauda (Ehr.) Duj.

Ph. pleuronectes (Mull.) Duj.

*Ph. polytrophos** Pochm.

Ph. pseudonordstedtii Pochm.

*Ph. pussilus** Lemm.

Ph. tortus (Lemm.) Skvor.

Trachelomonas bulla Stein

*T. pavlovskoensis** (Pojan.) Popova

*также β-мезосапробы

Chlorophyta

*Ankistrodesmus falcatus** (Corda) Ralfs

Chlamydomonas debargana Gor.

Chlorella vulgaris Beyer

*Chlorhormidium rivulare** (Kütz.) Star.

Chlorococcum infusionum Schrank

Chlorogonium elongatum Dang.
Closterium acerosum (Schr.) Ehr.
*Crucigenia rectangularis** (A.Br.)Gay.
*Gonium sociale** (Dang.) Warm.
*Heteromastix angulata** Korsch.
*Mesostigma viride** Laut.
*Microthamnion strictissimum** Rab.
*Spermatozopsis exultans** Korsch.
Spondylomorom quaternarium Ehr.
*Stigeoclonium tenue** Kütz.
Ulothrix zonata Kütz.
*также β-мезосапробы

3. β-МЕЗОСАПРОБЫ

Цианопхита

Anabaena aequalis Borg.
A. *affinis* Lemm.
A. *augstummalis* Schm.
A. *circinalis** Raben.
A. *flos-aquae* Breb. Ex Born. et Flah.
A. *lemmermannii* Canab.
A. *microspora** Kleb.
A. *oscillatorioides* Bory
A. *solitaria** Kleb.
A. *spiroides** Kleb.
Anabaenopsis arnoldii Apt.
Aphanizomenon issatschenkoi Ussacz.
*Aphanothece clathrata** West.
*Chroococcus limneticus** Lemm.
Ch. *turgidus** Kütz.
*Coelosphaerium kutzingianum** Nagel.
*Glocotrichia echinulata** (Smith) Richt.
G. *natana* Raben.
G. *pisum** (Ag.) Thur.

Gloeotheca rupestris (Lyngb.) Born.
Gomphosphaeria aponia Kütz.
*G. lacustris** Chod.
G. naegeliana Lemm.
G. pussila Komar.
*G. rosea** Lemm.
Lyngbya limnetica Lemm.
L. maior Men.
L. martensiana Men.
Merismopedia glauca Ehr.
M. punctata Meyen
*M. major** Geit.
Microcystis aeruginosa (Kütz.) Trev.
M. marginata Kütz.
M. viridis Lemm.
M. wesenbergii Komar.
Nodularia harveyana Thur.
N. spumigena Mert.
*Nostoc kihlmannii** Lemm.
N. piscinale Kütz.
N. pruniforme Ag.
N. verrucosum Vanch.
Oscillatoria agardhii Gomont
O. amphibia Ag.
*O. limnetica** Lemm.
O. redekei Van Goor.
Phormidium favosum (Bory) Gomont
Ph. subfuscum (Ag.) Kütz.
Ph. tinctorium Kütz.
Rhabdoderma lineare Schm. et Laut.
Rivularia aquatica (De Wild.) Geit.
Scytonema coactile Mont.
*также олигосапробы

Chrysophyta

*Chrysococcus klebsianus** Pasch.

*Ch. punctiformis** Pasch.

*Ch. rufescens** Klebs

*Chrysosphaerella longispina** Laut.

*Derepyxis dispar** Ltmn.

Dynobrion divergens Imh.

Hymenomonas roseola Stein

*Kephyrion ovum** Pasch.

*K. spirale** (Lack.) Conr.

*Mallomonas elegans** Lemm.

Microglena punctifera * Korsch.

Ochromonas fragilis Dofl.

*Pseudokephyrion entzii** Conr.

*Syncrypta volvox** Ehr.

*Synura petersenii** Korsch.

*также олигосапробы

Diatomeae

*Achnanthes lanceolata** Breb.

*A. minutissima** Kutz.

Amphipleura pellucida Kutz.

Amphora ovalis var. *gracilis** Kutz.

*Asterionella formosa** Hass.

Aulacoseira granulata (Ehr.) Sim.

A. italica (subarctica) (Mull.) Haw.

A. varians Ag.

*Caloneis silicula** (Ehr.) Hl.

Cocconeis pediculus Ehr.

Cymbella ehrenbergii Kutz.

C. lanceolata (Ehr.) Kirch.

C. ventricosa Kutz.

*Diatoma elongatum** Lyngb.

*D. vulgare** Bory

Epithemia sorex Kutz.
E. turgida (Ehr.) Kutz.
*Fragilaria capucina** Desm.
F. construens (Ehr.) Grun.
*F. crotonensis** Kitt.
Gomphonema acuminatum Kutz.
G. constrictum Ehr.
Gyrosigma acuminatum (Kutz.) Rab.
Navicula atomus (Kutz.) Grun.
N. gastrum (Ehr.) Kutz.
*N. gracilis** Ehr.
Nitzschia holsatica Hust.
N. longissima f. *parva* (Breb.) Ralfs
N. sigmoidea (Nitz.) W.Sm.
Pinnularia viridis (Nitz.) Ehr.
Rhoicosphenia curvata (Kutz.) Grun.
Stauroneis phoenicenteron Ehr.
*Stephanodiscus astraea** Grun.
Surirella biseriata Breb.
S. ovata (W. Sm.) Rab.
S. turgida W. Sm.
*Synedra actinastroides** Lemm.
S. acus Kutz.
S. berlinensis Lemm.
S. vaucheriae Kutz.
Tabellaria fenestrata var. *intermedia* (Lyngb.) Kutz.
*также олигосапробы

Xanthophyta

*Centritractus belenophorus** Lemm.
*Ophiocytium cochleare** A. Br.
Vaucheria geminata Gotz.
*также олигосапробы

Cryptophyta

*Chroomonas nordstedtii** Hansg.

*Cryptochrysis polychrystis** Pasch.

Cryptomonas gracilis Skuja

C. marssonii Skuja

C. pyrenoidifera Geitl.

*C. rostrata** Troitz.

C. rufescens Skuja

C. tetrapyrenoidosa Skuja

Rhodomonas lacustris Pasch. et Rutt.

*R. lens** Pasch.

*также олигосапробы

Dinophyta

Amphidinium lacustre Stein

*Gymmodinium aeruginosum** Stein

*G. mirabile** Penard

*Gyrodinium pusillum** Kof. et Sw.

*Wyloszinskia neglecta** (Shill.) Th.

*также олигосапробы

Euglenophyta

Colacium vesiculosum Ehr.

Euglena ehrenbergii Klebs

*E. gracilis** Klebs

E. hemichromata Skuja

*E. limnophila** Lemm.

E. oblonga Schm.

*E. oxyuris** Schmar.

E. physeter Fott.

E. sanguinea Ehr.

*E. spirogyra** Ehr.

E. tripteris Klebs

Lepocinclis fusiformis Lemm.

L. marssonii Lemm.
L. playfairiata Defl.
L. steinii Lemm.
Monomorphyna pyrum Ehr.
Phacus agilis Skuja
Ph. brevicaudatus (Klebs) Lemm.
Ph. caudatus Hubn.
*Ph. elegans** Pochm.
Ph. helicoides Pochm.
*Ph. horridus** Pochm.
Ph. inflexus (Kiss.) Pochm.
Ph. orbicularis Hubn.
Ph. skujai Skw. -
*Ph. suercicus** Lemm.
Ph. triqueter Ehr.
Strombomonas acuminata Defl.
S. fluviatilis Lemm.
S. gibberosa Play
S. rangoonensis Fott.
S. schauinslandii Lemm.
S. verrucosa Defl.
Trachelomonas abovata Stok.
T. abrupta Swir.
*T. allia** Drez.
T. armata Ehr.
T. caudata Ehr.
T. cervicula Stok.
T. conica Play
T. curta Da Cuna
*T. cylindrica** Ehr.
T. eurystoma Stein
T. hexangulata Swir.
T. hispida Stein
T. labiata Teil.

T. oblonga Lemm.
*T. planctonica** Swir.
T. pulcherrima Play
T. rugulosa Stein
T. similis Stok
T. stikesiana Palm.
*T. superba** Swir
T. varians Defl.
T. verrucosa Stok.
T. volvocinopsis Swir.
*также олигосапробы

Chlorophyta

Actinastrum hantzschii Lag.
*Bulbochaete intermedia** De-By
B. nana Witz.
Carteria vulgaris Troitzk.
Chaetophora elegans * (Roth.) Ag.
Characium gracilipes Lamb.
Chlamydomonas simplex Pasch.
Chlorococcum humicola (Naeg.) Rab.
Cladophora glomerata (L.) Kutz.
Closterium acicularis Smith
C. ehrenbergii Menegh.
C. moniliferum (Ehr.) Bory
C. parvulum Nag.
C. venus Kutz.
Coccomonas orbicularis Stein
Coelastrum microporum Naeg.
Crucigenia cruciata Schm.
C. fenestrata Schm.
Cosmarium formulosum Hoff.
Dyctyosphaerium pulchellum Wood.
Eudorina elegans Ehr.

*Haematococcus pluvialis** Flot. em Wille
*Hydrodictyon reticulatum** (L.) Lag.
Kirchneriella lunaris (Kirch.) Moeb.
Lobomonas stellata Chod.
Microthamnion kutzingianum Naeg.
Oedogonium capillare (L.) Kutz.
*Oocystis lacustris** Chod.
Pandorina morum (Mull.) Bory
Pediastrum boryanum (Turp.) Men.
P. duplex Mey.
P. tetras (Ehr.) Ralfs
*Pleurococcus viridis** Ag. (*Desmococcus vulgaris* Nag.)
Pteromonas angulosa Lemm.
Pyramimonas tetrahynchus Schm.
*Rhisoclonium hieroglyphicum** (Ag.) Kutz.
Scenedesmus abundans Smith
S. acuminatus (Lag.) Chod.
S. acutiformis Schr.
S. acutus Mey.
S. arcuatus Lemm.
S. armatus (Chod.) Smith
S. bijugatus (Turp.) Kutz.
S. brasiliensis Bohl.
S. denticulatus Lag.
S. hystrix Lag.
S. londus Mey.
S. obliquus (Turp.) Kutz.
S. opoliensis Richt.
*S. quadricauda** (Turp.) Breb.
*Scherffelia dubia** Pasch.
Selenastrum bibraianum Rein.
*Sorastrum spinulosum** Naeg.
Stigeoclonium flagelliferum Kutz.
Tetraedron caudatum (Cord.) Hansg.

T. regulare Turn.

Tetrastrum staurogeniaeforme (Schr.) Lemm.

Ulothrix tenerrima Kutz.

*Volvox aureus** Ehr.

V. globator (L.) Ehr.

*также олигосапробы

4. Олигосапробы

Суанопхита

Aphanothece stagnia Spreng.

Calothrix parietina Thur.

C. stagnalis Gomont

Chamaesiphon fuscus Hans.

Ch. incrustans Grun.

Ch. polonicus Hans.

Gloeocapsa sanguinea (Ag.) Kutz.

Plectonema tomasinianum Kutz.

Synechococcus aeruginosus Nagel.

Tolypothrix distorta Kutz.

T. tenuis Kutz.

Крисофита

Chromulina nebulosa Cienk.

Ch. ovalis Klebs

Ch. rosanoffii Butsch.

Chrysamoeba radians Klebs

Chrysococcus ornatus Pasch.

Chrysopyxis stenostoma Laut.

Dinobryon cylindricum Imh.

D. sertularia Ehr.

D. stipitatum Stein

D. suecicum Lemm.

Hydrurus foetidus Kirch.

Kephyrion poculum Conr.
K. rubriclaustri Conr.
Lagymion scherffellii Pasch.
Mallomonas acaroides Perty
M. acrocomos Rutt.
M. fastigata Zach.
M. insignis Pen.
Pseudokephyrion schilleri Conr.
Uroglena volvox Ehr.
Urogenopsis americana Lemm.

Diatomae

Amphora ovalis Kutz.
Asterionella gracilima (Hant.) Heib.
Aulacosira ambigua Mull.
A. binderata Kutz.
Bacillaria paradoxa Gmel.
Ceratoneis arcus (Ehr.) Kutz.
Cyclotella comta (Ehr.) Kutz.
Diatoma hiemale (Lyngb.) Heib.
Eunotia arcus (Ehr.) Rabh.
E. lunaris Grun.
E. major Rabh.
E. robusta Ehr.
E. triodon Ehr.
Fragilaria virescens Ralf.
Frustula vulgaris Thw.
Gomphonema angustatum (Kutz.) Rab.
Meridion circulare Ag.
Navicula dicephala Ehr.
Neidium iridis (Ehr.) Cl.
Pinnularia gibba Ehr.
P. mesolepta Ehr.
P. microstauron (Ehr.) Cl.

P. nobilis Ehr.
Rhizosolenia longiseta Zach.
Rhopalodia gibba (Kutz.) Mull.
Surirella spiralis Breb.
Tabellaria flocculosa (Roth) Kutz.

Xanthophyta

Botrydiopsis arhiza Snow
Botryococcus braunii Borzi
Centritractus dubius Lemm.
Characiopsis acuta A. Br.
Ch. lunaris Pasch.
Chloridella neglecta Pasch.
Chlorobotrys regularis West
Goniochloris soulpta Pasch.
G. tetragona Pasch.
G. torta Pasch.
Mischococcus confervicola Nag.
Ophiocytium maius Nag.
Pleurochloris pyrednoidosa Pasch.
Tetraedriella subglobosa Pasch.

Dinophyta

Ceratium cornutum (Ehr.) C. et Lach.
C. hirundinella Mull.
Cystodinium cornifax (Schill.) Klebs
Glenodiniopsis uliginosa (Schill.) Wol.
Gymmodinium palustre Schill.
Hemidinium nasutum Stein
Peridinium bipes Stein
P. inconspicuum Lemm.
P. palatinum Laut.
Sphaerodinium cinctum (Ehr.) Wol.

Englenophyta

Euglena mutabilis Schmitz

E. tatica Czosn.

Chlorophyta

Chaetonema irregulare Now.

Chara sp. Vail.

Closterium navicula (Breb.) Lutken.

Coleochaete scutata Breb.

Cosmarium turpinii Breb.

Cylindrocapsa involuta Rein.

Desmidium swartzii Ag.

Euastrum devaricatum Lund.

E. elegans (Breb.) Kutz.

E. verrucosum Ehr.

Geminella interrupta (Turp.) Lag.

Micrasterias crux-melitensis (Ehr.) Hass

M. rotata (Grev.) Ralfs

Mougeotia genuflexa (Dillw.) Ag.

Netrium digitus (Ehr.) Itzig. et Rothe

Nitella gracilis Ag.

Pleurotaenium trabecula (Ehr.) Nag.



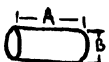


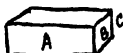




Zygnema stellinum (Vauch.) Czurda

Ulothrix tenuissima Kutz.

U. zonata (Web. Et Mohr) Kutz.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

**РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ ФОРМУЛЫ РАСЧЕТА ОБЪЕМА КЛЕТОК
ВОДОРОСЛЕЙ ПО ИХ ПАРАМЕТРАМ**

Шар $\pi A^3/6$		<i>Anabaena circinalis</i> <i>A. flos-aquae</i>
Эллипсоид $\pi AB^2/6$		<i>Anabaena cylindrica</i> <i>A. lemmermannii</i> <i>Cryptomonas ovata</i>
Цилиндр $\pi AB^2/4$		<i>Aulacoseira italica</i> , <i>Cyclotella</i> sp.
Два конуса $\pi AB^2/6$		<i>Ankistrodesmus falcatus</i> <i>A. pseudomiriabilis</i> <i>Schroederia setigera</i>
Конус $\pi AB^2/12$		<i>Dinobryon sociale</i>
Параллелепипед ABC		<i>Asterionella formosa</i>
Эллипсоид/конус $\pi B^2(A+B/2)/12$		<i>Mallomonas</i> sp. <i>Rhodomonas minuta</i>
Квадрат из 4-х $A^3/4$		<i>Crucigenia tetrapedia</i>
Неправильной формы $\pi/12 [AB^2+C^3+2ED^2+FG^2]$		<i>Ceratium hirundinella</i>
Неправильной формы $\pi AB^2/9$		<i>Peridinium</i> sp.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	1
Общие сведения	2
Морфологическая структура водорослей.....	5
Размножение водорослей.....	13
Экологические группировки водорослей.....	20
Планктонные водоросли.....	20
Бентосные водоросли (перифитон, обрастания).....	23
Влияние различных факторов среды на развитие водорослей.....	29
Изменение видового состава фитопланктона при эвтрофировании водоемов.....	36
Вертикальное распределение фитопланктона	41
Фитопланктон – как индикатор трофического статуса водоемов.....	43
Методы изучения пресноводного фитопланктона.....	47
Отбор проб фитопланктона	47
Выбор станций отбора проб	49
Отбор проб перифитона (обрастателей).....	50
Отбор проб фитобентоса.....	51
Консервация и хранение проб фитопланктона.....	52
Концентрирование проб фитопланктона	54
Методы окраски клеточных структур водорослей.....	58
Приготовление постоянных препаратов водорослей.....	64
Методы количественного учета водорослей	67
Микроскопирование проб водорослей.....	67
Методы определения биомассы фитопланктона.....	71
Содержание воды и золы в водорослях.....	71
Содержание азота и фосфора в водорослях.....	72
Определение биомассы водорослей по их численности.....	72
Определение биомассы водорослей по содержанию в них хлорофилла.....	74
Определение физиологического состояния водорослей	79

Лабораторные методы культивирования водорослей	85
Методы получения чистых культур водорослей	85
Питательные среды	88
Оценка степени загрязнения вод по наиболее показательным организмам	90
Система Кольквитца-Марссона и ее модификации	90
Вычисление средней сапробности биоценоза	91
Установление сапробных валентностей и индикаторного веса показательных организмов	96
Расширение системы Кольквитца-Марссона	97
Оценка степени загрязнения вод по видовому разнообразию организмов	99
Индексы видового разнообразия	99
Индексы сходства (сравнения)	102
Методы определения продукции фитопланктона	105
Отбор проб	106
Глубина, на которой определяется фотосинтез	106
Продукционные склянки	107
Продолжительность экспонирования пробы	109
Условия экспонирования проб	110
Определение интенсивности фотосинтеза	111
Скляночный метод в кислородной модификации	112
Радиоуглеродная модификация скляночного метода	117
Хлорофильный метод определения первичной продукции	122
Прижизненное выделение растворенного органического вещества водорослями	125
Литература	130
Приложение 1. Питательные среды для культивирования водорослей	135
Приложение 2. Список основных видов водорослей-индикаторов сапробности	138
Приложение 3. Репрезентативные формулы расчета объема клеток водорослей по их параметрам	153

Автор-составитель:

доктор биологических наук, профессор

Садчиков Анатолий Павлович

**МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ПРЭСНОВОДНОГО
ФИТОПЛАНКТОНА
(МЕТОДИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО)**

Отпечатано с готового оригинал-макета

**Типография Издательства Московского государственного университета
им. М.В.Ломоносова**

Формат 60x90 1/16. Усл. печ. л. 10,0. Заказ 1348

**Тел. 939-10-62, 939-16-86. Тел./факс 939-32-91
119899, Москва, Ленинские горы, МГУ, ул. Академика Хохлова, д. 11**