

Министерство образования и науки Российской Федерации
Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова
Кафедра ботаники и микробиологии

БОЛЬШОЙ ПРАКТИКУМ
ПРОДУКЦИЯ ФОТОСИНТЕЗА

Учебно-методическое пособие

Рекомендовано
Научно-методическим советом университета для студентов,
обучающихся по направлению Биология

Ярославль
ЯрГУ
2015

УДК 581.1(072)
ББК Е573.11я73
Б79

*Рекомендовано
Редакционно-издательским советом университета
в качестве учебного издания. План 2015 года*

Рецензент
кафедра ботаники и микробиологии ЯрГУ им. П. Г. Демидова

Составитель
кандидат биологических наук Г. В. Кондакова

Большой практикум. Продукция фотосинтеза :
Б79 учебно-методическое пособие / сост. Г. В. Кондакова ;
Яросл. гос. ун-т им. П. Г. Демидова. — Ярославль :
ЯрГУ, 2015. — 64 с.

В пособии рассмотрены некоторые теоретические вопросы и методы изучения первичной продуктивности водных экосистем, приведены описания лабораторных работ, контрольные вопросы по темам и рекомендуемая литература. Подбор тем занятий направлен на выработку у студентов навыков оценки состояния водоемов по фотосинтетической активности и морфологическим характеристикам фитопланктона.

Предназначено для студентов, обучающихся по направлению 06.03.01 (020400.62) Биология (дисциплина «Большой практикум», цикл БЗ), очной и заочной форм обучения.

УДК 581.1(072)
ББК Е573.11я73

© ЯрГУ, 2015

Введение

Необходимость измерения первичной продукции как первого этапа продукционного процесса, или начального уровня биотического потока энергии, стала получать широкое признание еще в 30-е гг. прошлого столетия. В настоящее время интерес к исследованиям первичной продукции водоемов не ослабевает. Вместе с аллохтонным органическим веществом фотосинтетическая продукция составляет материальную и энергетическую основу для всех последующих этапов продукционного процесса в водоеме. Характеристики фотосинтетического процесса используются при решении ряда теоретических и практических вопросов водной экологии. К ним относится оценка общей биологической продуктивности водоемов, итогом которой является рыбная продукция; эффективность утилизации органического вещества, созданного автотрофами, а также запасенной при этом энергии; оценка экологического состояния водных объектов, включающая их трофический статус и качество воды. Все это служит основой для прогноза изменений, рационального использования водных ресурсов, осуществления экологического мониторинга.

Широкое распространение измерений подводного фотосинтеза позволило получить многочисленные данные, составившие основу самостоятельной дисциплины общетеоретического и прикладного значения, в рамках которой и разработан данный курс.

Целями освоения дисциплины «Большой практикум. Продукция фотосинтеза» являются ознакомление студентов с основными критериями оценки функционирования водных экосистем, особенно при антропогенном воздействии, приобретение знаний и умений по регистрации нарушений в процессах первичного продуцирования водоемов под воздействием различного рода загрязнителей.

Процесс изучения дисциплины направлен на формирование следующих элементов компетенций в соответствии с ФГОС ВО, ОП ВО и приобретение следующих знаний, умений, навыков.

Код компетенции	Формулировка компетенции	Перечень планируемых результатов обучения
Общепрофессиональные компетенции		
ОПК-6	Способность применять современные экспериментальные методы работы с биологическими объектами в полевых и лабораторных условиях, навыки работы с современной аппаратурой	Знать: о продукционно-деструкционных процессах, протекающих в водоемах; альгологические методы, применяемые при оценке состояния водных экосистем; влияние различных антропогенных воздействий на морфологию, фотосинтез и дыхание первичных продуцентов; защитные механизмы первичных продуцентов в связи с загрязнением водной среды. Уметь: выбрать и обосновать метод исследования в зависимости от поставленной исследовательской задачи. Владеть навыками: определения интенсивности фотосинтетической активности первичных продуцентов и затрат кислорода на дыхание; расчета первичной продукции фитопланктона; определения морфологического состояния первичных продуцентов;

		обработки полученных результатов.
Профессиональные компетенции		
ПК-1	Способность эксплуатировать современную аппаратуру и оборудование для выполнения научно-исследовательских полевых и лабораторных биологических работ	Знать: устройство спектрофотометра и правила работы; устройство светового микроскопа и правила работы; устройство счетных камер (Горяева, Фукс-Розенталя) и правила работы с ними; принцип и правила титрования. Уметь: работать на спектрофотометре; работать на световом микроскопе; работать со счетными камерами (Горяева, Фукс-Розенталя); работать на титровальной установке. Владеть навыками: снятия и интерпретации показаний при работе на аппаратуре; подготовки проб для проведения титрования или инструментального исследования.

Тема 1. Первичная продукция водоемов и методы ее определения

1.1. Основные понятия и определения

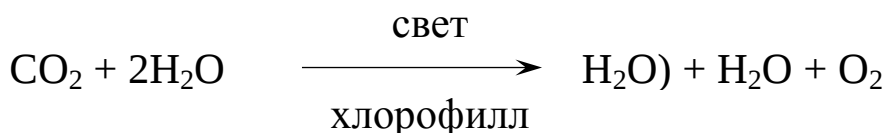
В водоемах, как и в любой экосистеме, осуществляется биотический круговорот веществ, при этом одновременно происходят процессы продуцирования (образования) органического вещества и его трансформации и минерализации.

Первичное органическое вещество может быть синтезировано внутри самого водоема за счет фотосинтеза фотоавтотрофов или бактериального хемосинтеза. Это **автохтонное** органическое вещество. Органические вещества, поступающие в водоем извне, с площади его водосбора, называют **аллохтонными**.

Определение первичной продукции можно найти во многих монографиях, справочниках и учебных пособиях. **Первичная продукция** (*primary production*) — это величина, характеризующая прирост количества органического вещества, образованного за определенное время автотрофными организмами из простых неорганических компонентов, в расчете на единицу площади или объема водоема. Понятие первичной продукции применяют не только в отношении фотоавтотрофных организмов, но и хемоавтотрофов.

Основная часть первичного органического вещества в гидросфере создается в результате фотосинтеза **фитопланктона**. **Фитонейстон**, **фитобентос**, **фитоперифитон**, **макрофиты** в морях, крупных и глубоких озерах обычно вносят меньший вклад в первичную продукцию по сравнению с водорослями планктона. В малых озерах, дельтах рек, некоторых других водоемах может наблюдаться обратная картина.

В процессе фотосинтеза энергия солнечной радиации, поглощенная фотоавтотрофами, трансформируется в потенциальную энергию органических веществ с участием ферментных систем, связанных с хлорофиллом. Этот процесс и его конечный результат могут быть выражены в виде:



При расщеплении воды образуется газообразный кислород, из диоксида углерода и восстановленного из воды водорода синтезируются углеводы (CH_2O) и вновь образуется вода. В темноте фотосинтез прекращается, прекращается потребление диоксида углерода из среды и выделение эквивалентного количества кислорода. Процессы дыхания у растений в темноте идут с той же скоростью, что и на свету. Поэтому, сравнивая результаты жизнедеятельности водного сообщества на свету и в темноте, можно рассчитать значение первичной продукции.

Кислород, выделяющийся при фотосинтезе, оказывает влияние на физико-химические свойства природных вод и определяет условия жизнедеятельности гидробионтов. Поступление кислорода в водную среду может осуществляться также за счет газообмена с атмосферой, что имеет место в быстротекущих и холодных водоемах, где почти отсутствуют водные растения и водоросли. В большинстве же водоемов фотосинтетическая аэрация преобладает над атмосферной. Фотосинтетические процессы как в чистых, так и особенно в загрязненных водах, могут достигать высокого уровня и оказывать большое влияние на формирование качества и самоочищение вод.

Первичную продукцию выражают в различных эквивалентных единицах. Наиболее распространенными *единицами измерения* являются:

- *количество ассимилированного углерода* в процессе фотосинтеза за единицу времени в расчете на единицу площади или объема

$$\text{г (мг) C} / \text{м}^2 (\text{л, м}^3) \text{ в сутки (час);}$$

- или *количество выделенного кислорода* в процессе фотосинтеза в тех же расчетных единицах

$$\text{г (мг) O}_2 / \text{м}^2 (\text{л, м}^3) \text{ в сутки (час).}$$

Эти единицы измерения взаимозэквивалентны, 1 мг O_2 эквивалентен 0,375 мг «С».

Различают *валовую* и *чистую* (или эффективную) первичную продукцию.

Валовая первичная продукция является мерой количества вещества и энергии, которое было ассимилировано автотрофными организмами в процессе фотосинтеза за единицу времени.

Однако часть образованных продуктов фотосинтеза сразу же подвергается окислению в процессе дыхания (деструкции) фотосинтезирующих организмов. Под **деструкцией** понимают совокупность стадий продукционного процесса, представляющих собой этапы разрушения и минерализации органических веществ, сопровождающиеся потреблением кислорода и рассеянием энергии.

Оставшуюся часть, которая представляет собой разность между валовой первичной продукцией и деструкцией и идет на прирост биомассы фотосинтезирующих организмов, называют **чистой**, или **эффективной, первичной продукцией**.

Чистая первичная продукция макрофитов равна сумме максимальной за сезон их биомассы и массы опада. Для планктона чистая продукция — это разность между валовой первичной продукцией и дыханием (деструкцией) всего планктона. В этом случае оценивается не только дыхание водорослей планктона, но и дыхание зоо- и особенно бактериопланктона. При этом получают представление о результирующем значении процессов образования и деструкции органических веществ в планктоне в целом.

Чистую продукцию планктона следует отличать от чистой продукции фитопланктона, которая представляет собой валовый фотосинтез за вычетом затрат кислорода на дыхание только фитопланктона. Последняя величина, для обозначения которой используется также понятие «*траты на обмен*», не поддается прямому измерению и чаще всего остается неизвестной или оценивается косвенным образом. Обычно принимают, что траты на обмен фитопланктона в среднем достигают 15–20 % от валовой первичной продукции.

Таким образом, **биотический баланс** в водоеме может быть выражен равенством:

$$A - R = \pm P,$$

где A — новообразование органических веществ в водоеме, или валовая первичная продукция (*assimilation*);

R — интенсивность дыхания или деструкция (*respiration*);

P — чистая первичная продукция.

Знак « $\pm$ », стоящий у последнего члена балансового равенства, говорит о том, что баланс органических веществ в водоеме может быть и положительным и отрицательным. В первом слу-

чае ($A - R > 0$ или $A / R > 1$) процессы образования органических веществ преобладают над процессами деструкции и в водоеме происходит накопление органических веществ. Во втором ($A - R < 0$ или $A / R < 1$) — преобладают процессы деструкции и запасы органических веществ уменьшаются.

Суммарные за год или вегетационный сезон значения продукции и деструкции отражают эффективность продукционных процессов в водоеме в целом. Отрицательный баланс органического вещества часто наблюдается в олиготрофных¹ озерах, а также в некоторых водохранилищах с неустоявшимся режимом. В таких водоемах в биотических процессах важную роль играют аллохтонные органические вещества. В планктоне велика доля бактерий, продукция которых нередко сопоставима с продукцией фитопланктона. Для мезотрофных и эвтрофных озер характерно отношение $A / R \approx 1$. Отношение A / R за год выше единицы только в редких случаях.

Существуют различные методы определения первичной продукции фитопланктона: скляночный в его кислородной и радиокислородной модификациях, хлорофилльный, флюоресцентный и некоторые другие.

В данном пособии рассмотрены наиболее распространенные методы исследования продукции фитопланктона, с которыми знакомятся студенты при изучении курса.

1.2. Кислородная модификация скляночного метода определения первичной продукции водоемов (кислородный метод)

Первые измерения первичной продукции провел Георгий Георгиевич Винберг в 1932 г. на озере Белое (в Косине под Москвой). Для этого он предложил метод «темных и светлых склянок», суть которого в том, что о количестве образовав-

¹ **Трофность** — характеристика местообитания (водоема) по его биологической продуктивности, обусловленной содержанием биогенных элементов. В зависимости от трофности различают *олиготрофные, мезотрофные, эвтрофные, гипертрофные* водоемы.

шегося в ходе фотосинтеза органического вещества судят по количеству выделившегося кислорода.

Кислородный метод в настоящее время широко применяется в экспедиционных и лабораторных условиях, он прост, позволяет рассчитать как валовую, так и чистую продукцию. В основе метода лежит определение кислорода в изолированных пробах воды. Для наблюдения используют склянки из белого стекла объемом 100–200 мл с притертыми пробками. Часть склянок должна быть специально затемнена. Три склянки — исходную (или начальную), светлую (не затемненную) и темную (специально затемненную) — заполняют водой из исследуемого водоема. В исходной склянке «фиксируют» растворенный в воде кислород для определения начального его содержания. Заполненные водой темные и светлые склянки экспонируют определенное время обычно в водоеме на той же глубине, где были взяты пробы. Время экспозиции устанавливают в зависимости от возможностей эксперимента. Чаще всего оно составляет одни сутки, т. к. за этот период проходят все циклические суточные изменения условий в водоеме (освещенности, температуры и т. д.). В отдельных случаях время экспозиции может быть больше или меньше суток. После экспозиции склянок в них также фиксируют растворенный в воде кислород. Валовую первичную продукцию (А) за время экспозиции склянок определяют по разности содержания кислорода в светлой и темной склянках в конце экспозиции. Величину деструкции органических веществ, связанную с тратами на обмен организмов планктонного сообщества (R), определяют по уменьшению содержания растворенного кислорода в темной склянке по сравнению с исходным. Чистая первичная продукция представляет собой разность $A - R$, или разницу между содержанием кислорода в светлой склянке после экспозиции и содержанием кислорода до экспонирования.

1.2.1. Лабораторная работа 1

Определение первичной продукции фитопланктона кислородным методом

Цель работы: освоить кислородную модификацию скляночного метода определения первичной продукции водоемов (кислородный метод).

Задачи:

1. Получить представление о продукционно-деструкционных процессах, протекающих в водоемах.
2. Освоить метод определения растворенного в воде кислорода по Винклеру.
3. Рассчитать показатели продукционного процесса для модельного водоема: валовую и чистую продукцию, деструкцию.

Объект исследования: модельный водоем (смешанная культура водорослей).

Реактивы:

- 1 — реактивы Винклера:
 - а) щелочной раствор иодида калия ($\text{NaOH} + \text{KJ}$);
 - б) хлорид марганца MnCl_2 32 %;
- 2 — серная кислота H_2SO_4 1:1;
- 3 — серная кислота H_2SO_4 25 %;
- 4 — тиосульфат натрия (устар. гипосульфит) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,01 н;
- 5 — калий двуххромовокислый (хромпик) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,01 н;
- 6 — иодид калия KJ 15 %;
- 7 — крахмал 0,2 %;
- 8 — среда Прата.

1. Подготовка проб

Определение первичной продукции проводят в склянках с притертыми пробками — **пикнометрах**, предварительно откалиброванных по объему. Для постановки опыта необходимо 6 пикнометров: 2 — для определения исходного (начального) содержания кислорода, 2 — для экспозиции на свету, 2 — для темновой экспозиции.

Пикнометры наполняют водой из исследуемого водоема осторожно, исключая образование пузырьков. Если они образо-

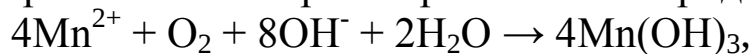
вались, необходимо дать им возможность выйти, постукав по стенке пикнометра. В двух пикнометрах сразу же фиксируют растворенный в воде кислород для определения его исходного содержания методом Винклера (см. п. 2). Остальные пикнометры закрывают пробкой так, чтобы под ней не оставалось пузырьков воздуха, и помещают на экспозицию. Скрылки, предназначенные для экспозиции на свету, помещают в инкубатор с искусственным освещением (люминостат) при освещении 3 000–6 000 лк. Скрылки для темновой экспозиции тщательно заворачивают в плотную светонепроницаемую материю или фольгу, которая плотно облегалa скрылку и отражает солнечные лучи. Время экспозиции — 2 ч. После экспозиции в световых и темновых пикнометрах также фиксируют растворенный в воде кислород для определения его содержания методом Винклера.

2. Определение растворенного в воде кислорода по Винклеру

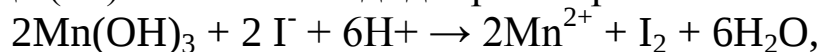
Сущность метода

Классический метод Винклера для определения растворенного в воде кислорода относится к методам иодометрического титрования по замещению (прил. 1). Он основан на окислении марганца (II) в щелочной среде растворенным кислородом и последующем окислении иодида гидроксидами марганца (III) и марганца (IV) при подкислении раствора.

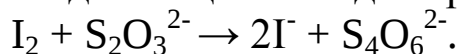
К пробе воды, содержащей растворенный кислород, добавляют реактивы Винклера — хлорид (или сульфат) марганца и щелочной раствор иодида калия. В щелочной среде ионы Mn^{2+} быстро окисляются растворенным кислородом:



При подкислении раствора гидроксиды марганца (III) и марганца (IV) окисляют иодид и растворяются:



Выделяющийся иод титруют тиосульфатом натрия:



Хотя в результате окисления марганца (II) кислородом получается смесь гидроксидов $Mn(OH)_3$ и $MnO(OH)_2$ с неизвест-

ным соотношением компонентов, это не осложняет анализ, т. к. количество выделившегося иода остается эквивалентным количеству растворенного кислорода.

Точность метода при соблюдении всех необходимых процедур, включая 2–3-кратную повторность, составляет $\pm 0,05$ мг O_2 /л.

Ход определения

1. В заполненный водой пикнометр прибавляют реактивы Винклера по 1 мл каждого. Пипетку с реактивами следует опустить на 1/3 пикнометра и осторожно прилить реактивы. Сначала вводят раствор $NaOH$ с KJ , а затем $MnCl_2$.

2. Пикнометр закрывают пробкой так, чтобы под ней не оставалось пузырьков воздуха, и содержимое перемешивают. Образующийся осадок распределяется по всему пикнометру и приобретает окраску в зависимости от концентрации кислорода.

3. Пробу с зафиксированным кислородом ставят в темное место на 2 ч или 1 сутки в зависимости от возможности дальнейшего анализа.

4. По истечении этого времени пикнометр осторожно открывают и прибавляют 1 мл H_2SO_4 (1:1). Пипетку опускают в пикнометр примерно до 1/4 от верхней части, кислоту вливают осторожно, иначе осадок поднимется вверх и может частично вылиться при закрытии пробкой.

5. Пикнометр закрывают пробкой так, чтобы под ней не оставалось пузырьков воздуха. Содержимое пикнометра перемешивают и ждут, пока растворится весь осадок. Если осадок растворяется медленно (это бывает, когда проба с зафиксированным кислородом долго стоит), пробу перемешивают несколько раз.

6. После полного растворения осадка приступают к титрованию. Титрование следует провести как можно быстрее, избегая попадания света на пробы, чтобы не происходило разрушение иода. Для этого содержимое пикнометра осторожно, не разбрызгивая, выливают в коническую колбу. Титруют раствором тиосульфата натрия до получения еле заметного желтого цвета. Потом прибавляют 0,5 мл 0,2 %-го раствора крахмала и по-

лучившийся синеватый раствор титруют осторожно до полного обесцвечивания.

7. Часть бесцветного раствора переливают обратно в пикнометр, ополаскивают его и снова переливают в колбочку. Раствор от этого чуть посинеет. Пробу окончательно дотитровывают путем прибавления нескольких капель из бюретки до полного обесцвечивания раствора.

8. Окончательный результат титрования записывают в рабочий журнал. Расчет количества кислорода в мг O_2 /л:

$$\frac{H \times M \times 0,08 \times 1000}{V_1 - V_2}, \quad (1)$$

где H — количество тиосульфата натрия, пошедшего на титрование пробы;

M — поправочный коэффициент 0,01 н раствора тиосульфата натрия;

V_1 — объем пикнометра, мл;

V_2 — количество прибавленных реактивов Винклера, мл;

0,08 — коэффициент для вычисления содержания кислорода в мг (1 мл 0,01 н раствора тиосульфата натрия соответствует 0,08 мг кислорода);

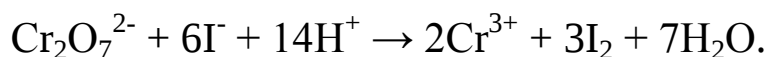
1 000 — пересчет на 1 000 мл (1 л).

9. Определение проводят в двух повторностях, для расчета первичной продукции берут среднее значение.

Определение поправочного коэффициента к нормальности тиосульфата натрия

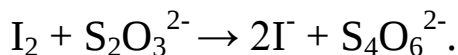
Малая устойчивость растворов тиосульфата натрия вызывает необходимость периодической проверки его титра. При этом определяют поправочный коэффициент к его нормальности. Поступают следующим образом.

В колбу емкостью 100–150 мл последовательно наливают 1 мл 15 %-го раствора KJ , 3 мл 25 %-й H_2SO_4 , 20 мл 0,01 н раствора хромпика. Хромпик следует взять в точно известном количестве калиброванной пипеткой Мора. После добавления хромпика выделяется свободный иод в соответствии с реакцией:



Раствор при этом окрашивается в коричнево-желтый цвет. Колбу необходимо закрыть часовым стеклом, чтобы не улетучивался свободный иод, и оставить стоять на 5–10 мин, чтобы все молекулы хромпика прореагировали с КJ.

Выделившийся I_2 титруют тиосульфатом натрия, при этом он окисляет ион $S_2O_3^{2-}$ в соответствии с реакцией:



При титровании свободного иода тиосульфат сначала прибавляют из бюретки струей, а когда раствор приобретет слабо-желтый цвет, прибавляют его по каплям до получения еле заметного желтого цвета. Затем вносят 0,5 мл 0,2 %-го раствора крахмала и титруют до исчезновения синеватой окраски.

Необходимо иметь в виду, что образовавшийся ион Cr^{3+} придает раствору слабо-зеленую окраску, затрудняя определение конца реакции. Поэтому используют следующий прием. Берут в качестве стандарта одну колбу с оттитрованным раствором и добавляют в нее 3 – 5 капель тиосульфата для получения заведомо перетитрованного раствора (прибавляемый тиосульфат не изменяет цвета). Цвет титруемых следующих колбочек сравнивают с этой колбой.

Необходимо сделать 3 повторных определения. Среднее значение используют для расчета поправочного коэффициента (М) по формуле:

$$M = 20 : N, \quad (2)$$

где 20 — количество (мл) взятого 0,01 н раствора хромпика;
N — количество (мл) тиосульфата, пошедшее на титрование.

3. Расчет показателей продукционного процесса

1. Валовая продукция:

$$A = (V_C - V_T) / t \quad \text{мг } O_2 / \text{л} \cdot \text{ч} \quad (3)$$

2. Деструкция:

$$R = (V_H - V_T) / t \quad \text{мг } O_2 / \text{л} \cdot \text{ч} \quad (4)$$

3. Чистая продукция:

$$P = (V_C - V_H) / t \quad \text{мг } O_2 / \text{л} \cdot \text{ч} \quad (5)$$

$$\text{или } P = A - R, \quad (6)$$

где V_C — количество кислорода в светлой склянке после экспозиции;

V_H — количество кислорода в темной склянке после экспозиции;

V_H — начальное содержание кислорода в склянке;

t — время экспозиции.

Следует учитывать помехи при иодометрическом титровании, обусловленные составом водной среды: повышенным содержанием органического вещества (при окисляемости более 15 мг O_2 /л), железа (более 1 мг/л), нитритов (более 0,05 мг/л) и др. восстановителей и окислителей.

Необходимо также учитывать особенности использования метода изолированных проб. Метод склянок предполагает замкнутый объем, поэтому при интенсивном фотосинтезе возможно ингибирующее действие кислорода, накапливающегося в пробе. Кроме того, в присутствии большого количества зоопланктона (если не наполнять пикнометры через планктонный газ) возможна убыль фитопланктона за счет выедания его зоопланктоном, масштабы которого в изолированных склянках могут быть иными по сравнению с водоемом.

Несмотря на то, что метод имеет ряд уязвимых мест, связанных главным образом с изолированием организмов в замкнутом объеме, он продолжает оставаться наиболее распространенным в продукционных исследованиях фитопланктона.

4. Оформление лабораторного журнала

1. Тема занятия.
2. Название лабораторной работы.
3. Цель и задачи работы.
4. Объект исследования.

5. Ход работы.

5.1. Подготовить пробы воды для определения растворенного кислорода.

Все пикнометры подписать: начальные **Н**, световые — **С**, темновые — **Т**. Указать объем каждого пикнометра.

Заполнить пикнометры водой. Зафиксировать кислород в начальных склянках, световые и темновые склянки поставить на экспозицию.

5.2. Найти поправочный коэффициент к нормальности тиосульфата натрия, проведя три повторных определения.

Обязательно указать количество титранта в каждой повторности, среднее значение и расчет поправочного коэффициента.

5.3. Определить начальное содержание растворенного в воде кислорода (V_H) по Винклеру.

Обязательно указать количество титранта в каждой повторности, среднее значение и расчет количества кислорода.

5.4. После окончания времени экспозиции определить содержание растворенного в воде кислорода по Винклеру в световых (V_C) и темновых (V_T) пикнометрах. Указать все необходимые данные аналогично п. 5.3.

5.5. Провести расчет показателей продукционного процесса.

Полученные результаты занести в таблицу (табл.1).

Таблица 1

Результаты определения показателей продукционного процесса в модельном водоеме

Показатель	Содержание O_2 , мг O_2 /л			Показатели продукционного процесса, мг O_2 /л · ч		
	V_H	V_C	V_T	A	R	P
Значение						

6. Сделать вывод о продукционно-деструкционных процессах, протекающих в модельном водоеме. Для оценки полученных результатов можно воспользоваться данными, приведенными в прил. 2.

1.3. Радиоуглеродная модификация скляночного метода определения первичной продукции водоемов (радиоуглеродный метод)

Наиболее чувствительным считается радиоуглеродный метод (метод Стимана — Нильсона, 1951) с использованием радиоактивного изотопа углерода ^{14}C . Радиоуглеродная модификация сводится к следующему. В пробу воды вносят изотоп углерода ^{14}C в виде карбоната или гидрокарбоната натрия с известной радиоактивностью. После некоторой экспозиции склянок воду из них отфильтровывают через мембранный фильтр и определяют на фильтре радиоактивность клеток планктона. Скорость фотосинтеза (мг С/л) рассчитывают по формуле:

$$A = (r_d / R_d) C.$$

где C — содержание углекислоты в воде (мг С/л);

r_d — радиоактивность планктона на фильтре;

R_d — радиоактивность вещества, внесенного в склянку.

Радиоуглеродная модификация скляночного метода почти на два порядка чувствительнее кислородной модификации. Это позволяет использовать ее для наблюдений за первичной продукцией олиготрофных водоемов и на таких глубинах в более продуктивных водах, где фотосинтез по приросту кислорода неощутим. Погрешность радиоуглеродной модификации связана в основном с наличием так называемой внеклеточной продукции, не учитываемой стандартными методами, и разрушением клеток фитопланктона при фильтрации проб воды через мембранные фильтры. Внеклеточной, или экстрацеллюлярной, продукцией называют прижизненное выделение клетками водорослей во внешнюю среду продуктов фотосинтеза. Поэтому с помощью этой модификации получают неопределенные значения первичной продукции, которые оказываются близкими к значениям либо чистой либо валовой продукции.

1.4. Хлорофилльный метод определения первичной продукции водоемов

При определении первичной продукции большим успехом пользуется выявление содержания фотосинтетических пигментов, в частности хлорофилла *a*, т. к. этот пигмент — неотъемлемый элемент всех зеленых растений — выполняет функцию основного «светосборщика» и ответствен за новообразование органического вещества при фотосинтезе. Определение концентрации хлорофилла *a* служит в настоящее время одним из необходимых методов исследования биологической продуктивности вод, он получил признание при оценке интенсивности самоочищения природных вод, степени их эвтрофирования. Применимость метода оправдана тем, что количество этого пигмента является одной из основных функциональных характеристик природного фитопланктона и достаточно хорошо отражает нагрузку вод биогенными элементами, в первую очередь азотом и фосфором. Как и первичная продукция, концентрация хлорофилла *a* в определенной мере позволяет судить о трофности водного объекта. В. В. Бульоном был предложен индекс трофического состояния (ИТС):

$$\text{ИТС} = 40 + 20 \lg \text{Хл } a \quad (7)$$

Значения индекса, который находится в хорошем соответствии со шкалой трофности, предложенной Г. Г. Винбергом (1960), составляют < 40 в олиготрофных водах, 40–60 — в мезотрофных и > 60 — в эвтрофных при концентрациях хлорофилла соответственно < 1, 1–10 и > 10 мкг/л (прил. 2).

Хлорофилльный метод определения первичной продукции основан на использовании показателей содержания и состояния хлорофилла в воде. Существенное преимущество этого метода заключается в том, что он не требует экспонирования продукционных склянок. Однако хлорофилльный метод измерения первичной продукции является достаточно приближенным из-за трудностей точного определения концентрации пигментов в естественном сообществе фитопланктона, содержащего различные группы водорослей.

Первичную продукцию при использовании хлорофилльного метода рассчитывают по следующей формуле:

$$P = \frac{R \times C \times AЧ}{K}, \quad (8)$$

где P — первичная продукция, мг C / л в час;
 R — относительный фотосинтез;
 C — концентрация хлорофилла a , мг Хл a /л;
 $AЧ$ — ассимиляционное число, мг C / на мг хлорофилла a в ед. времени;
 K — коэффициент экстинкции.

Члены уравнения K и R введены в расчет первичной продукции для того, чтобы учесть характер затухания солнечной радиации в водной толще (коэффициент экстинкции K) и зависимость интенсивности фотосинтеза фитопланктона от количества солнечной радиации, падающей на водную поверхность в течение светового дня (относительный фотосинтез R).

Для определения коэффициента экстинкции K пользуются подводным пиранометром, позволяющим измерить интенсивность солнечной радиации на разных глубинах. Тогда константу поглощения света в воде на глубине (коэффициент экстинкции K) определяют по формуле:

$$K = \ln (I_0 / I_c),$$

где I_0 и I_c — интенсивность радиации у поверхности и на глубине.

Показатель относительного фотосинтеза R учитывает гомогенность распределений фитопланктона в водной среде, что, как правило, наблюдается в природе. Для его определения пользуются эмпирическими графиками, которые показывают относительный фотосинтез в 1 м³ при световом насыщении водной поверхности и на глубинах, где интенсивность света составляет 50, 25, 10 и 1 % от поверхностной. В этом случае находят величину первичной продукции для каждого отдельного горизонта.

Показатель $AЧ$ в формуле введен для оценки фотосинтетической активности фитопланктона. Он отражает величину скорости фотосинтеза, т. е. количество CO_2 в миллиграммах, усвоенное на единицу содержания хлорофилла в единицу времени.

Экспериментально установлено, что АЧ при оптимальном освещении варьирует незначительно как для фитопланктонных сообществ, так и для культур водорослей и составляет 3,7 мг С / на мг хлорофилла *a* в час. Отсюда значение АЧ = 3,7 было принято для расчета первичной продукции.

Следует отметить, что в настоящее время получили широкое распространение методы бесконтактной регистрации концентрации хлорофилла *a* при использовании аэрокосмического дистанционного зондирования, в частности на основе данных спутниковых сканеров цвета океана. Для расчета первичной продукции в этом случае применяют различные по структуре и сложности математические модели.

1.4.1. Лабораторная работа 2

Определение первичной продукции фитопланктона хлорофилльным методом

Для модельных водоемов с культурами показатели К и R не учитывают, поэтому при эмпирически установленном ассимиляционном числе 3,7 определение первичной продукции сводится к определению хлорофилла в пробе воды.

Определение концентрации хлорофилла *a* может быть сделано спектрофотометрическим методом с экстракцией этанолом в диапазоне от 0,1мкг/л до максимальных значений, встречающихся в поверхностных водах различной трофности: от ультраолиготрофных до политрофных. Методика измерений установлена РД 52.24.784-2013.

Цель работы: ознакомиться с хлорофилльным методом определения первичной продукции водоемов.

Задачи:

1. Подготовить пробы воды для экстрагирования пигментов и получить экстракт хлорофилла *a*.
2. Ознакомиться с правилами работы на спектрофотометре и определить оптическую плотность полученного экстракта.
3. Рассчитать концентрацию хлорофилла *a* и первичную продукцию фитопланктона исследуемого водоема.

Объект исследования: модельный водоем (смешанная культура водорослей).

Реактивы и материалы:

- 1 — порошок углекислого магния MgCO_3 ;
- 2 — спирт этиловый (этанол) 96 %;
- 3 — соляная кислота HCl 0,5 М раствор;
- 4 — вода дистиллированная;
- 5 — фильтры мембранные «Владипор МФАС-ОС-2», 0,45 мкм по ТУ 6-55-221-1-29-89 или другого типа, равноценного по характеристикам;
- 6 — фильтры бумажные обеззоленные «белая лента» по ТУ 6-09-1678-86.

1. Подготовка проб

Хлорофилл *a* легко разрушается под воздействием света, при повышении температуры и в кислой среде, поэтому при проведении всех процедур, начиная от момента отбора пробы и до окончания спектрофотометрирования, необходимо обеспечить нахождение объекта анализа (пробы воды, фильтра с осадком или экстракта) в затемненном прохладном месте при отсутствии паров кислоты. Продолжительность анализа одной пробы не должна превышать 3 ч.

Отбирают пипеткой 50 мл пробы из водоема (в 2–3-кратной повторности). Объем пробы определяют в зависимости от предполагаемой концентрации хлорофилла *a* (прил. 3). Этот объем требуется отфильтровать через мембранный фильтр, вставленный в фильтрующее устройство с воронкой типа Зейтца. Фильтрование проводят под вакуумом или под давлением (в том числе самотеком), перепад давления от 0,15 до 0,20 атм. Продолжительность фильтрования не должна превышать 15 мин.

Для предупреждения разложения хлорофилла и облегчения его экстрагирования перед фильтрованием поверхность мембранного фильтра покрывают углекислым магнием (MgCO_3). Для этого готовят MgCO_3 в виде суспензии: порошок MgCO_3 тщательно растирают в фарфоровой ступке с добавлением небольшого количества дистиллированной воды, рекомендуемая концентрация MgCO_3 в суспензии 30 г/л.

Для получения на фильтре плотного и равномерного по толщине слоя MgCO_3 наливают в фильтровальную воронку 5 мл тщательно взболтанной суспензии MgCO_3 , создают перепад давления, пропуская ее до полного осаждения. Фильтр с суспензией подсушивают на воздухе, после чего приступают к фильтрованию отобранной пробы. После окончания фильтрования необходимо подсушить фильтр с помощью фильтровальной бумаги, подкладывая ее в несколько слоев под фильтр с осадком и меняя три раза в течение 15 мин.

2. Подготовка фильтров

Дистиллированную воду в небольшом объеме заливают в сосуд, в котором производят кипячение (бикс, химический стакан, эмалированная кастрюля и т. п.). Дистиллированную воду в сосуде доводят до температуры от 80 °С до 90 °С, после чего нагрев убавляют. Далее осторожно с помощью пинцета достают мембранные фильтры из пачки и по одному помещают на поверхность воды для предотвращения скручивания. Дистиллированную воду с помещенными в нее мембранными фильтрами медленно доводят до кипения и кипятят на слабом огне в течение 15 мин. После кипячения проводят выбраковку деформированных фильтров. Затем воду сливают и заменяют небольшим количеством (чтобы покрыть мембранные фильтры) стерильной дистиллированной воды. После этого мембранные фильтры готовы к использованию. Готовые мембранные фильтры хранят в дистиллированной воде в закрытом боксе.

3. Экстрагирование пигментов

1. Слой MgCO_3 , содержащий отфильтрованную взвесь, снимают скальпелем с мембранного фильтра и полностью переносят в фарфоровую ступку.

2. Добавляют 2 мл 96 %-го этанола и в течение 2 мин взвесь тщательно растирают.

3. Перетертую взвесь с этанолом переносят в плоскодонную колбу вместимостью 30 мл, закрывают пробкой для предотвращения потерь экстрагента. Колбу слегка встряхивают и погружают в нагретую до температуры 75 °С водяную баню. Нагре-

вают сосуд до 5 мин. Затем экстракту дают остыть и сливают его в центрифужную пробирку, смывая этанолом остатки пигмента из колбы. Объем экстракта в центрифужной пробирке доводят этанолом до 10 мл.

4. Для удаления из экстракта светорассеивающей взвеси его центрифугируют при 4 000–5 000 g в течение 15 мин. Чистота экстракта контролируется по оптической плотности на 750 нм. Последняя не должна превышать 0,005 относительных единиц на каждый сантиметр рабочей длины кюветы. При более высокой плотности центрифугирование следует повторить.

5. Прозрачный экстракт переносят в стеклянную мерную пробирку, при необходимости доводят его объем этанолом до объема фотометрической кюветы и закрывают пробирку притертой пробкой.

Экстракт переносят в темное холодное место (холодильник) для отстаивания в течение 15 мин.

4. Спектрофотометрирование экстракта

1. Чистый экстракт переносят пипеткой в спектрометрическую кювету. При спектрофотометрировании используют кюветы с рабочей длиной от 0,5 до 5,0 см в зависимости от объема экстракта и его оптической плотности. Последняя должна находиться в диапазоне от 0,05 до 0,8 относительных единиц.

2. Измерение оптических плотностей проводят на длинах волн 664 (максимум поглощения хлорофилла *a* в интактных клетках) и 750 нм (поправка на мутность экстракта) до и после подкисления экстракта. Экстракт перед повторным измерением подкисляют 0,01 мл соляной кислоты (0,5 М раствор) на 10 мл объема экстракта. Во вторую кювету — кювету сравнения — наливают 96 %-й этиловый спирт.

5. Расчет концентрации хлорофилла *a*

Для расчета концентрации хлорофилла *a* предварительно рассчитывают оптическую плотность экстракта до и после подкисления.

Поглощающую способность экстракта перед подкислением *A* (отн. ед.) вычисляют по формуле:

$$A = A_{664} - A_{750} , \quad (9)$$

где A_{664} — оптическая плотность экстракта на длине волны 664 нм до подкисления; A_{750} — оптическая плотность экстракта на длине волны 750 нм до подкисления.

Поглощающую способность экстракта после подкисления A_a (отн. ед.) вычисляют по формуле:

$$A_a = A'_{664} - A'_{750} , \quad (10)$$

где A'_{664} — оптическая плотность экстракта на длине волны 664 нм после подкисления; A'_{750} — оптическая плотность экстракта на длине волны 750 нм после подкисления.

Концентрацию хлорофилла a в пробе X (мкг/л), вычисляют по формуле

$$X = \frac{(A - A_a)}{K_c} \cdot \frac{R}{R - 1} \cdot \frac{V_s}{V_s \cdot d} \cdot 10^3 , \quad (11)$$

где K_c — коэффициент для хлорофилла a , равный 82 л/(мг · см);

R — отношение (A/A_a) для чистого хлорофилла a , равное 1,7;

V_e — объем использованного экстракта, мл;

V_s — объем отфильтрованной пробы, мл;

d — длина кюветы, см.

При использовании 90 %-го этанола концентрацию хлорофилла a вычисляют по упрощенной формуле:

$$X = 29,6(A - A_a) \cdot \frac{V_s}{V_s \cdot d} . \quad (12)$$

Ориентировочные соотношения между количеством хлорофилла a в экстракте, длиной кюветы, объемом экстракта в кювете, концентрацией хлорофилла a в экстракте и оптической плотностью D_{664} приведены в прил. 4.

6. Расчет первичной продукции

Первичную продукцию (P , мг С / л · ч) рассчитывают по формуле:

$$P = 3,7 \times X \times 10^{-3} \quad (13)$$

7. Оформление лабораторного журнала

1. Тема занятия.
2. Название лабораторной работы.
3. Цель и задачи работы.
4. Объект исследования.
5. Ход работы.

Описать все этапы работы, привести необходимые расчеты.

6. Рассчитать ИТС (по Бульону) для исследованного водоема (формула 7).

7. По результатам работы сделать вывод о величине первичной продукции в модельном водоеме и его трофическом статусе.

Для оценки полученных результатов можно воспользоваться данными, приведенными в прил. 2.

Для сравнения с кислородным методом можно воспользоваться переходным коэффициентом: 1 мг O_2 эквивалентен 0,375 мг «С».

Контрольные вопросы по теме 1

1. Объясните понятия «автохтонное» и «аллохтонное» органическое вещество.

2. Что такое «первичная продукция»? Какие организмы принимают участие в ее создании в гидросфере?

3. Напишите и объясните уравнение, отражающее конечный результат процесса фотосинтеза.

4. Каковы единицы измерения первичной продукции?

5. Объясните понятия «валовая», «чистая» первичная продукция, «деструкция». Приведите примеры.

6. Уравнение биотического баланса в водоемах: его составляющие, их соотношение и информативность.

7. Что такое «трофность» водоема? Какие типы водоемов выделяют по этому показателю?

8. Объясните суть кислородного метода определения первичной продукции водоемов. Кем он был впервые применен?

9. Сущность титриметрического анализа. Основные приемы титрования. Иодометрический метод.

10. Методика определения растворенного в воде кислорода по Винклеру. Химия процесса. Расчет количества кислорода.

11. Методика определения и расчет поправочного коэффициента к нормальности тиосульфата натрия.

12. Расчет показателей продукционного процесса.

13. С чем могут быть связаны ошибки при определении продукции кислородным методом?

14. В чем заключается радиоуглеродный метод определения первичной продукции? Сравните с кислородным методом.

15. Хлорофилльный метод определения первичной продукции водоемов: суть метода, расчет концентрации хлорофилла *a* и первичной продукции.

16. Чем можно объяснить применимость использования данных по концентрации хлорофилла *a* для определения первичной продукции и трофической классификации вод?

17. Что такое «коэффициент экстинкции» и «ассимиляционное число»?

18. Экологические группировки водорослей. Их краткая характеристика. Роль водорослей в жизни водоема.

19. Фитопланктон. Условия формирования. Приспособления. Видовой состав пресноводного и морского фитопланктона.

20. Фитобентос. Условия формирования. Приспособления. Экологические и размерные группы. Видовой состав пресноводного и морского фитобентоса.

21. Фитонейстон и фитоперифитон пресных водоемов. Видовой состав. Приспособления. Соотношение понятий «фитобентос» и «фитоперифитон».

22. Свет как экологический фактор, влияющий на состав и распределение водорослей в альгоценозах. Адаптации водорослей.

23. Температура и кислотность среды как экологические факторы, определяющие распространение водорослей. Экологические группировки водорослей по отношению к температуре и pH среды.

24. Биотические факторы, влияющие на состав и распределение водорослей в альгоценозах.

25. Факторы, определяющие продуцирование органического вещества в водоемах.

26. Каково теоретическое и прикладное значение изучения первичной продукции водоемов?

Рекомендуемая литература

Основная

1. Алимов, А. Ф. Элементы теории функционирования водных экосистем / А. Ф. Алимов. — СПб. : Наука, 2001.
2. Воропаева, О. Г. Экологическая альгология с основами биоиндикации : текст лекций / О. Г. Воропаева. — Ярославль : ЯрГУ, 2009.
3. Минеева, Н. М. Первичная продукция планктона в водохранилищах Волги / Н. М. Минеева. — Ярославль : Принтхаус, 2009.
4. РД 52.24.784-2013. Массовая концентрация хлорофилла а. Методика измерений спектрофотометрическим методом с экстракцией этанолом. Утв. приказом Федеральной службы по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды от 13.08.2013 г. № 415. Дата введения: 01.12.2013 г. — URL : <http://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293773/4293773922.htm>

Дополнительная

1. Бульон, В. В. Первичная продукция и рыбопродуктивность водоемов: моделирование и прогноз / В. В. Бульон // Биология внутренних вод. — 2006. — № 1. — С. 48–57.
2. Винберг, Г. Г. Первичная продукция водоемов / Г. Г. Винберг. — Минск : Изд-во АН БССР, 1960.
3. Пырина, И. Л. Кислородный метод определения первичной продукции фитопланктона / И. Л. Пырина // Методические вопросы изучения первичной продукции планктона внутренних водоемов. — СПб. : Гидрометеоиздат, 1993. — С. 10–13.
4. Фефилов, Ю. В. Разработка и создание информационной технологии дистанционного определения параметров первичной продуктивности в системах мониторинга океана : автореф. дис. ... канд. технических наук / Ю. В. Фефилов. — М., 2003.

Ресурсы сети Интернет

Электронная библиотека учебных материалов ЯрГУ.
— URL : http://www.lib.uniyar.ac.ru/opac/bk_cat_find.php

Тема 2. Экспериментальная оценка влияния токсических веществ на фитопланктон

В континентальные водоемы в результате хозяйственной деятельности человека, а также естественным путем попадают разнообразные органические и неорганические вещества, что может быть причиной загрязнения водоемов.

Различают «первичное» и «вторичное» загрязнение водоемов.

Первичным считается загрязнение за счет попадания в водоем органических и неорганических веществ, которые могут оказывать токсическое действие на гидробионтов.

Вторичным считается загрязнение, возникающее за счет отмирания большого количества водных растений и их разложения, что имеет место при **эвтрофировании**² и **цветении водоемов**³.

Органическими токсичными соединениями являются моющие средства (СМС), нефть и продукты ее переработки, фенол и его производные, пестициды. К органическим нетоксичным веществам относят разлагающуюся древесину, волокна целлюлозы в районе стоков целлюлозно-бумажных предприятий, органическое вещество фекальных стоков. Из минеральных веществ наиболее токсичны для гидробионтов тяжелые металлы (ртуть, свинец, кадмий, медь и др.), радиоактивные вещества.

Ответные реакции водорослей на действие антропогенных факторов оказываются наиболее быстрыми, вследствие чего структурные характеристики фитопланктона могут служить репрезентативными показателями состояния водных экосистем. На этом основано использование многих параметров состояния водорослевого сообщества для целей биологического монито-

² **Эвтрофирование** (евтрофирование) — повышение интенсивности продуцирования органического вещества вследствие увеличения содержания в водоемах азота, фосфора и других биогенных элементов. Различают естественное и антропогенное эвтрофирование.

³ **Цветение водоемов** (воды) — массовое развитие в водоеме микроскопических планктонных водорослей, обычно относящихся к какому-либо одному виду и вытесняющих другие виды. Толща воды при этом окрашивается в цвет, соответствующий окраске самой водоросли (зеленый, коричневатый, сине-зеленый, красноватый, желтый).

ринга. Вместе с тем водоросли различных таксономических рангов служат индикаторами для качественной характеристики экосистемы: наличие или отсутствие некоторых из них свидетельствует об уровне *сапробности*⁴ и *токсобности* водоема.

Водоросли наравне с бактериями и водными грибами принимают участие в процессах самоочищения природных вод. Они минерализуют органические соединения, накапливают в своих клетках токсичные элементы, способствуют осаждению их на дно. Процесс минерализации органических веществ проходит поэтапно. Р. Кольквитцем и М. Марссоном (R. Kolkwitz, M. Marsson, 1908), а позже Р. Пантле и Г. Букк (R. Pantle, G. Buck, 1955) в модификации В. Сладечека (V. Sládeček, 1969, 1973) и др. предложено деление вод на 4 зоны в зависимости от степени загрязнения (самоочищения).

Полисапробная зона характеризуется значительным загрязнением воды. Здесь много свежей органики в форме белков, кислородные условия — анаэробные, характер биохимических процессов — восстановительный, много сероводорода и углекислоты. Содержание бактерий в 1 см³ — миллионы клеток. Кроме бактерий, развиваются бесцветные жгутиковые, инфузории, из водорослей — эвглены, чаще бесхлорофилльные, некоторые формы синезеленых водорослей. Общий характер населения — много особей и мало видов.

α(Альфа)-мезосапробная зона характеризуется более слабым загрязнением, самоочищение уже прошло первую стадию. Кислородные условия — полуанаэробные, характер биохимических процессов — восстановительно-окислительный, присутствует сероводород, довольно много углекислоты. Азотные соединения в форме аминокислот, амидов. Содержание бактерий в 1 см³ — сотни тысяч. Из гидробионтов встречаются, кроме

⁴ **Сапробность** 1) для водоема — степень загрязнения; 2) для гидробионтов — комплекс физиолого-биохимических свойств организма, обуславливающий его способность обитать в воде с тем или иным содержанием органических веществ, т. е. с той или иной степенью загрязнения. **Токсобность** 1) для водоема — степень загрязнения токсичными веществами; 2) для гидробионтов — способность организмов обитать в воде, содержащей различное количество токсичных веществ (ГОСТ 27065-86).

бактерий, водные грибы, инфузории, синезеленые водоросли, некоторые зеленые и диатомовые. Общий характер населения — много особей и сравнительно немного видов.

β(Бета)-мезосапробная зона — воду можно считать умеренно загрязненной. Кислородные условия — аэробные, характер биохимических процессов — окислительный, сероводород содержится иногда в небольшом количестве, содержание кислорода и углекислоты может значительно колебаться в зависимости от времени суток, ночью у дна могут наблюдаться заморы. Соединения азота в форме нитритов и нитратов. Содержание бактерий в 1 см³ — десятки тысяч. Очень разнообразна альгофлора, доминируют зеленые, диатомовые, встречаются синезеленые водоросли, характерные для чистых вод. Большое количество ракообразных, рыбы. Общий характер населения характеризуется разнообразием видов.

Олигосапробная зона — это зона чистых вод. Здесь азот представлен в форме солей азотной кислоты, много кислорода и мало углекислоты. Вода не загнивает, бактерий содержится сотни — десятки в 1 см³. Доминируют зеленые, диатомовые, динофитовые, золотистые водоросли. Из животных много ракообразных, рыбы. Общий характер населения — много видов и мало особей. В олигосапробной зоне органическое загрязнение отсутствует, процесс самоочищения завершен.

Таким образом, степень загрязнения водоема или его зоны можно определить по составу обитающих в нем живых организмов. Этот метод получил название «***биоиндикация***, или метод биологического анализа вод». Те виды, которые реагируют на изменение среды изменением своей численности, морфологии, физиологических функций, относят к ***видам-индикаторам***. Из водорослей индикаторами считаются около 1 000 видов. Составлены списки организмов-индикаторов с указанием их сапробности. Эти списки постоянно корректируются и расширяются.

Водоросли могут служить биологическими индикаторами не только острых, но и долговременных токсических эффектов, что позволяет активно вмешиваться в ситуации до наступления необратимых процессов в водных экосистемах.

Микроскопические водоросли играют не менее важную роль в процессах очистки сточных вод. Сточные воды, регенерированные с помощью самых современных физико-химических методов, все же оказываются токсичными по отношению к гидробионтам водоемов, принимающих эти стоки. Альгологические сообщества, используемые в доочистке стоков, позволяют получить воду, которая по гидрохимическим и бактериологическим показателям соответствует требованиям МУ 2.1.5.800-99 «Организация госсанэпиднадзора за обеззараживанием сточных вод». Культивирование микроводорослей на бытовых сточных водах, а также на отдельных видах сточных вод предприятий пищевой, легкой, химической промышленности, микробиологических производств и животноводческих комплексов усиливает процессы их очистки. В результате фотосинтеза водорослей происходит насыщение сточных вод кислородом (фотосинтетическая аэрация), что обеспечивает активность гетеротрофных микроорганизмов, осуществляющих минерализацию органических веществ, способствует исчезновению характерного запаха. Инокулирование нефтесодержащих сточных вод хлорококковыми водорослями способствует очистке их от нефтепродуктов на 40–70 %. Скорость очистки сточных вод от фенола в присутствии инокулята водорослей увеличивается до 20 %. Использование водорослями для роста и развития биогенных элементов, содержащихся в сточных водах, сопровождается снижением минеральных форм азота на 80–90 %, фосфора на 50–90 %. Массовое развитие водорослей в сточных водах приводит к значительному возрастанию скорости отмирания патогенных микроорганизмов. Это может быть связано с выделением водорослями антибактериальных веществ, а также изменением величины pH в сторону щелочности, что является нормальным при интенсивном фотосинтетическом процессе.

Учитывая важную роль водорослей в процессах самоочищения водоемов, нельзя не отметить то влияние, которое оказывают на них различные токсичные соединения. Исследования, проведенные на культурах, и эксперименты *in situ* показали, что токсиканты вызывают морфологические и ультраструктур-

ные изменения в клетках, угнетают синтез белка и хлорофилла, фотосинтетическую активность и, как следствие, влияют на величину первичной продукции.

На лабораторных занятиях студенты выполняют ряд работ по изучению влияния некоторых токсических веществ на функциональные характеристики фитопланктона.

2.1. Влияние загрязнения водоемов тяжелыми металлами на фитопланктон

Среди разнообразных загрязняющих веществ тяжелые металлы (ТМ) и их соединения выделяются распространенностью, высокой токсичностью, многие из них также способностью к накоплению в живых организмах. Попав в организм, металлы-токсиканты чаще всего не подвергаются каким-либо существенным превращениям, как это происходит с органическими токсикантами, и, включившись в биохимический цикл, они крайне медленно покидают его. Наиболее опасными для живых организмов являются ртуть, свинец, кадмий, медь, никель, цинк, хром.

ТМ и их соединения в водоемах вызывают разнообразные реакции среди гидробионтов. Первичной реакцией водорослей на действие ТМ является внеклеточное связывание катионов металлов с ионно-обменными центрами клеточной стенки и наружной поверхностью плазматической мембраны. Связывание катионов — быстрый, пассивный физико-химический процесс, сопровождающийся выделением протонов. Это процесс обратимый, однако критические дозы металла изменяют проницаемость клеточной стенки и плазмалеммы, что способствует поступлению ТМ внутрь клеток водорослей.

Об изменении проницаемости клеточных оболочек свидетельствует выход из клеток ионов калия. При этом содержание других важнейших катионов — натрия и кальция — в клетках практически остается неизменным. Установлено, что выход калия под действием ТМ не является результатом гибели клеток: водоросли, у которых потеря калия достигала 70–80 %, после переноса в контрольную среду были способны к росту. Не обнаружено также прямого обмена между калием и ТМ, вызываю-

щим его выход из клетки. В то же время потеря калия и накопление ТМ приводило к нарушению солевого обмена у водорослей и изменению распределения основных катионов между клеткой и средой. Внутри клетки ТМ образуют комплексы с низкомолекулярными белками, индуцируя их синтез *de novo*, что указывает на один из существующих механизмов детоксикации тяжелых металлов в клетке.

Показано, что одновременно с поступлением ТМ у водорослей активируются процессы выделения токсичного металла из клеток. Считается, что выведение металлсодержащих метаболитов имеет активный характер и является одним из защитных механизмов. Так, исследование динамики накопления меди водорослями показало, что наиболее интенсивно биоаккумуляция происходит в течение первых суток экспозиции. Затем скорость поглощения заметно снижается и наблюдается сдвиг равновесия «поглощение $\rightleftharpoons$ выделение» в направлении активации процессов, удаляющих токсичный металл из клеток. Однако основная часть аккумулированного металла прочно удерживается в клетках и обнаруживается во фракциях, содержащих белки и другие высокомолекулярные соединения, что приводит к нарушению роста водорослей. В итоге токсичность ТМ для водорослей обусловлена их накоплением в клетке, поскольку поступление металла существенно превышает его выведение в окружающую среду.

Известно, что ионы ТМ в невысокой концентрации стимулируют развитие планктонных водорослей, выступая необходимыми микроэлементами, входящими в состав ферментных систем. При увеличении концентрации ТМ начинает проявляться их токсический эффект.

Следствием аккумуляции водорослями токсичных концентраций металлов оказывается ингибирование метаболических процессов, среди которых следует выделить следующие:

- снижение скорости деления клеток, в результате чего время генерации возрастает на порядок. В связи с этим в токсикологических экспериментах с водорослями при обосновании продолжительности опытов следует исходить из времени их генерации;
- удлинение латентной фазы роста популяции водорослей за счет изменения скорости деления клеток;

- морфологические аномалии клеток, выражающиеся в их измельчании по сравнению с контролем, появлении гигантских клеток, изменении формы клеток, фрагментации трихомов, переходе в пальмеллоидную стадию. Так, для хлорококковой водоросли *Scenedesmus quadricauda* при внесении в среду комплексов меди выявлено увеличение размеров крайних клеток ценобия и появление в популяции «гигантских» клеток;

- нарушение синтеза фотосинтетических пигментов и уменьшение ассимиляции углекислоты водорослевыми клетками. Токсическое действие ТМ особенно проявляется в снижении количества хлорофилла *a* и увеличении доли его неактивной формы — феофитина. Следствием этого является нарушение фотосинтетического аппарата и изменение продукционных характеристик водорослей, чувствительных к токсичным металлам. Происходит изменение цвета синезеленых водорослей (цианобактерий) на светло-желтый и полное обесцвечивание зеленых водорослей. Для фитопланктона в целом величина первичной продукции может изменяться не столь заметно из-за разной устойчивости популяций водорослей к ТМ.

Специальные исследования показали, что между общей концентрацией ТМ в природных поверхностных водах и их токсичностью нет однозначной зависимости. Биологическая активность ТМ, поступающих в водную среду, определяется в значительной мере их химическими формами.

Попав в водоем, ТМ распределяется между компонентами водной экосистемы следующим образом: 1) металл в растворенной форме; 2) сорбированный и аккумулированный фитопланктоном; 3) удерживаемый донными отложениями в результате седиментации взвешенных органических и минеральных частиц из водной среды; 4) адсорбированный на поверхности донных отложений непосредственно из водной среды в растворимой форме; 5) находящийся в адсорбированной форме на частицах взвеси. Кроме аккумулирования ТМ за счет адсорбции и последующей седиментации, в водной среде происходит связывание ионов металлов с растворенными органическими веществами. Общая концентрация ТМ в воде в результате всех этих процессов не меняется.

Общепризнано, что наиболее доступными и токсичными для гидробионтов являются свободные (аква-ионы), т. е. не включенные в комплексы или в состав взвесей и коллоидов, ионы металлов (рис. 1).

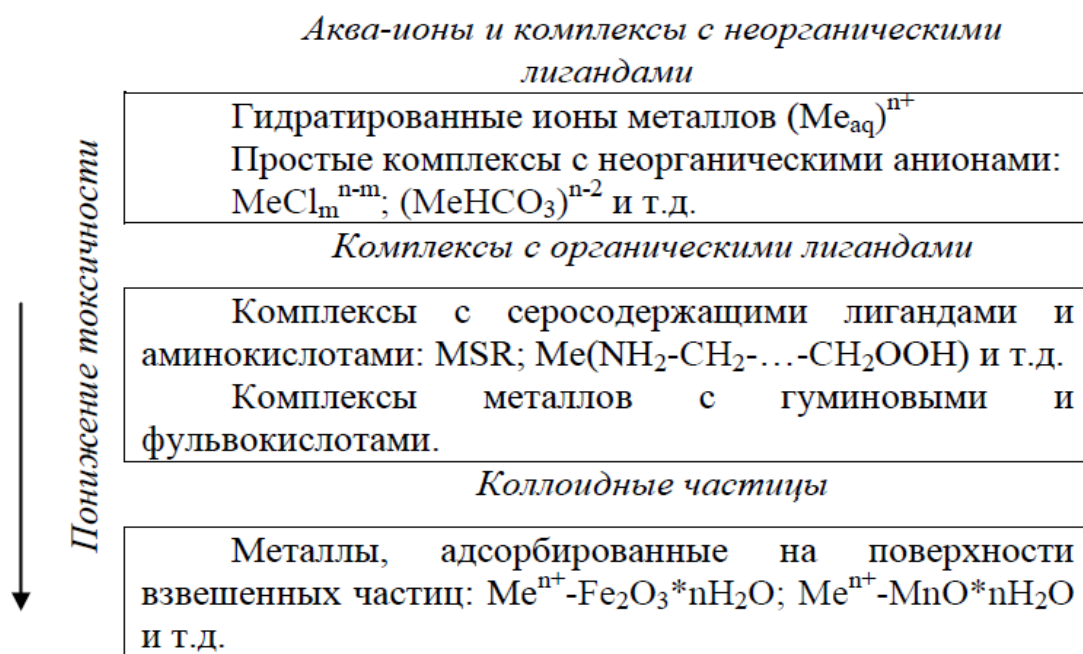


Рис. 1. Характеристика степени токсичности ТМ в зависимости от их форм в поверхностных водах (по Г. К. Будникову, 1998).

Среди органических веществ в наибольшей степени способны связывать ионы ТМ в прочные комплексы гуминовые кислоты. Так, показано, что они способны снижать биодоступность Cu^{2+} и Cd^{2+} для фитопланктона, причем наибольшая степень снижения токсичности в пробах природной воды была выявлена для Cu^{2+} . Кроме того, установлено синергетическое и антагонистическое действие тяжелых металлов при их совместном присутствии в среде. Отрицательные эффекты с явным взаимным усилением токсичности выявлены, например, для ртути и меди, ртути и кадмия.

Все это необходимо учитывать при определении предельно допустимых концентраций (ПДК) для гидробионтов. ПДК отдельных металлов, получаемые без анализа комплексообразования и их комбинированного действия, оказываются лишь приблизительными и не отражают реальную токсичность тяжелых металлов.

На основе установленных токсичных концентраций и реакций водорослей на возрастание уровня металлов в среде выявлены виды с разной устойчивостью к действию ТМ, что позволяет использовать их в качестве биоиндикаторов в контроле состояния водных экосистем в условиях антропогенного загрязнения. Способность водорослей аккумулировать ТМ из водной среды в концентрациях, существенно превышающих их уровень в воде, позволяет использовать их в качестве мониторов при количественной оценке загрязнения водных экосистем опасными токсикантами.

Биоцидное действие ТМ используют для борьбы с водорослями, вызывающими «цветение» водоемов. Применяемые в этих целях препараты называются *альгициды*. Наиболее распространенным альгицидом является медный купорос CuSO_4 . Доза его для водохранилищ составляет 0,1–0,5 мг/л по меди. Скопление положительно заряженных катионов меди на мембранах, несущих отрицательный заряд, нарушает проницаемость клеточных оболочек. Альгицидный эффект возникает вследствие замены катиона магния в молекуле хлорофилла катионом меди.

Существенным недостатком данного способа является нестабильность катионов меди в водной среде и относительно быстро понижающаяся концентрация активной формы. После временного уничтожения «цветения» или его подавления наступает стимуляция развития водорослей. Это вызывает необходимость повторных обработок, однако вследствие токсичности для других гидробионтов (прил. 5) применение медного купороса надлежит в каждом случае согласовывать с органами санитарно-эпидемиологической службы и охраны рыбных запасов.

2.1.1. Лабораторная работа 3–4

Изучение влияния тяжелых металлов на микроводоросли в остром и хроническом экспериментах

Цель работы: изучить влияние ТМ на первичную продукцию и морфологическую изменчивость микроводорослей.

Задачи:

1. Поставить острый и хронический эксперименты по изучению влияния ТМ на микроводоросли.
2. Рассчитать показатели продукционного процесса (валовую и чистую продукцию, деструкцию) микроводорослей при различных концентрациях ТМ в остром и хроническом экспериментах.
3. Определить состояние водорослей в начале и конце экспериментов.
4. Сравнить результаты острого и хронического экспериментов.

Объект исследования: чистые или смешанные альгологические культуры микроводорослей р.р. *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Nostoc*.

Реактивы:

1. Реактивы, перечисленные в лабораторной работе 1.
2. Растворы солей ТМ (медь, свинец, цинк, кадмий) различных концентраций.
3. Среда Прата.

1. Постановка острого эксперимента

Для постановки эксперимента необходимо 12 пикнометров: 6 контрольных и 6 опытных. В каждом варианте 2 пикнометра используют для определения исходного (начального) содержания кислорода, 2 — для экспозиции на свету, 2 — для темновой экспозиции.

В контрольные пикнометры вносят исследуемую культуру водорослей в количестве 10 мл на 100 мл объема пикнометра и осторожно доливают доверху средой Прата. Используют культуру с начальной плотностью клеток не менее 1 млн кл/мл. В опытные пикнометры так же вносят исследуемую культуру, добавляют раствор ТМ с таким расчетом, чтобы в пикнометрах создать концентрацию ионов металла 0,1–30 ПДК по рыбохозяйственной регламентации (прил. 3) и доливают средой Прата. Растворы ТМ готовят на среде Прата. По 2 пикнометра из контрольного и опытного вариантов используют для определения исходного содержания кислорода методом Винклера. Остальные пикнометры закрывают пробками и помещают на световую

и темновую экспозицию. Световая экспозиция в люминостате при освещении 3 000–6 000 лк. Длительность эксперимента 2 ч. После экспозиции в световых и темновых пикнометрах обоих вариантов фиксируют растворенный в воде кислород и определяют его содержание методом Винклера.

По результатам эксперимента необходимо рассчитать валовую, чистую продукцию и деструкцию, изучить морфологические изменения клеток по сравнению с контролем.

2. Постановка хронического эксперимента

Для постановки эксперимента необходимо 12 колб на 250 мл с ватно-марлевыми пробками: 6 контрольных и 6 опытных. Во все колбы вносят по 15 мл исследуемой культуры водорослей с начальной плотностью клеток не менее 1 млн кл/мл и доливают средой Прата с таким расчетом, чтобы общий объем содержимого каждой колбы составил 150 мл.

В опытные колбы добавляют раствор ТМ в таком же количестве, как для острого эксперимента. Все колбы помещают на экспозицию в люминостат при освещении 3 000–6 000 лк и температуре 20 ± 2 °С на 7–14 суток (в зависимости от возможностей эксперимента). Соблюдают световой суточный ритм. Культуру водорослей периодически перемешивают, встряхивая 1–2 раза в сутки.

По окончании времени экспозиции сначала отмечают визуально наблюдаемые изменения опытных культур по сравнению с контролем (изменение окраски, опускание на дно, гомогенность или агрегация и т. д.), после чего культуры микроскопируют, отмечают морфологические изменения клеток и колоний по сравнению с контролем.

Затем переходят к определению показателей продукционного процесса. Для этого содержимое каждой колбы переливают в пикнометр, получая таким образом 12 заполненных пикнометров: 6 контрольных и 6 опытных. По 2 пикнометра из контрольного и опытного вариантов используют для определения начального содержания кислорода методом Винклера. Остальные пикнометры закрывают пробками и помещают на световую и темновую экспозицию на 2 ч. После экспозиции во всех пик-

нометрах фиксируют растворенный в воде кислород и определяют его содержание методом Винклера. По результатам эксперимента необходимо рассчитать валовую, чистую продукцию и деструкцию в контрольном и опытном вариантах.

3. Оформление лабораторного журнала

1. Тема занятия.
2. Название лабораторной работы.
3. Цель и задачи работы.
4. Объект исследования.
5. Действующее вещество.

Указать, с каким металлом и в какой концентрации поставлены эксперименты.

6. Ход работы.

6.1. Подготовить пробы для постановки острого и хронического экспериментов.

Подписать пикнометры для острого эксперимента: 6 пикнометров — контроль (**К**), 6 пикнометров — опыт (**О**). В контрольных и опытных пикнометрах отметить пикнометры для определения начального содержания кислорода (**Н**), световые (**С**), темновые (**Т**).

Определить и записать объем каждого пикнометра.

Подписать колбы для хронического эксперимента: 6 колб — контроль (**К**), 6 — опыт (**О**).

Заполнить пикнометры и колбы, как это указано в п. 1 и 2.

Зафиксировать кислород в начальных склянках острого эксперимента, световые и темновые склянки поставить на экспозицию 2 ч.

Колбы для хронического эксперимента поставить на экспозицию.

6.2. Найти поправочный коэффициент к нормальности тиосульфата натрия, проведя три повторных определения (формула 2).

Обязательно указать количество титранта в каждой повторности, среднее значение и расчет поправочного коэффициента.

6.3. Определить начальное содержание растворенного в воде кислорода (V_H) по Винклеру в контрольных и опытных склянках острого эксперимента (формула 1).

Обязательно указать количество титранта в каждой повторности, среднее значение и расчет количества кислорода.

6.4. После окончания времени экспозиции изучить морфологию клеток и особенности колоний водорослей, используя световой микроскоп с объективом 40×. Зарисовать и сравнить клетки в контрольном и опытном вариантах.

6.5. Определить содержание растворенного в воде кислорода по Винклеру в световых (V_C) и темновых (V_T) пикнометрах. Указать все необходимые данные аналогично п. 6.3.

Провести расчет показателей продукционного процесса, используя формулы 3–6.

Полученные результаты занести в таблицу (табл. 2).

Таблица 2

***Результаты определения показателей
продукционного процесса культуры водорослей
под воздействием ТМ
(острый / хронический эксперимент)***

Вариант опыта	Содержание O_2 , мг O_2 / л			Показатели про- дукционного про- цесса, мг O_2 / л · ч		
	V_H	V_C	V_T	A	R	P
Контроль						
ТМ, мг/л концентрация 1						
ТМ, мг/л концентрация 2						
ТМ, мг/л концентрация 3						

6.6. На следующем занятии, по окончании времени экспозиции хронического эксперимента, завершить опыт, как это указано в п. 2.

Повести все необходимые действия и расчеты аналогично острому опыту (п. 6.2 – 6.5).

Изучить морфологию клеток водорослей, используя световой микроскоп с объективом 40×. Зарисовать колонии и клетки

в контрольном и опытном вариантах, отметить изменения размеров клеток и формы колоний, отмирание и др. признаки.

Провести расчет показателей продукционного процесса. Полученные результаты занести в таблицу, аналогичную табл. 2.

6.7. По результатам работы сделать выводы о влиянии различных концентраций ТМ на функциональные характеристики и морфологию культур водорослей в остром и хроническом эксперименте.

Проиллюстрировать результаты изучения показателей продукционного процесса графически, построив столбчатые диаграммы для обоих экспериментов.

2.2. Влияние нефтепродуктов на первичную продукцию пресноводных водорослей

Нефть относится к числу наиболее распространенных для водной среды загрязнителей. Формы нахождения и состояния нефти в водной среде отличаются особой сложностью, многообразием и динамичностью из-за многокомпонентности этого природного субстрата, в составе которого насчитывают сотни соединений с различными свойствами. Попавшие в воду нефтепродукты непрерывно разлагаются под влиянием физических, химических и микробиологических процессов, распределяются между поверхностной пленкой, раствором и твердой фазой. Особенно быстро нефть разлагается в первые 10–12 суток после контакта с водой, а затем скорость распада существенно замедляется. Еще быстрее (в течение первых суток и даже часов) происходит испарение легких фракций нефти с поверхности воды. При оценке биологических последствий нефтяного загрязнения внимание уделяют растворимым фракциям нефти, обладающим максимальной токсичностью. К ним относятся углеводороды ароматического ряда, в том числе бензол, составляющий до 20 % ароматических углеводородов сырой нефти, некоторые канцерогенные вещества типа бензапирена и др.

Особенностью углеводородов нефти и нефтепродуктов является способность проникать в жировую ткань организмов, обитающих в воде. Здесь даже самые нестойкие углеводороды

сохраняются, не контактируя с нефтеокисляющими бактериями. В связи с этим создается возможность транспорта углеводов нефти в общей трофической цепи и проникновение этих веществ в организм человека.

Эффект воздействия нефти и нефтепродуктов на фитопланктон неоднозначен и зависит от многих факторов и условий. Основными являются такие, как видовая чувствительность, концентрации растворенных в воде фракций, длительность контакта с ними фитопланктона и др. В зависимости от этих факторов действие нефти и нефтепродуктов может быть стимулирующим, безразличным и угнетающим.

Установлено, что реакция культур водорослей на подавляющие их рост концентрации (10 и 20 ПДК) проявляется в уменьшении сухой массы, концентрации пигментов, показателей удельного содержания хлорофилла *a* в биомассе, усилении процессов перекисного окисления липидов в клетках водорослей. Чистая продукция при концентрации бензина 10–20 ПДК снижалась до 6 раз, наблюдалось превышение поглощения кислорода над выделением. Такие же концентрации дизельного топлива приводили к снижению первичной продукции в 2 и 16 раз соответственно. При высокой солнечной инсоляции ингибирующее влияние нефтепродуктов на фотосинтез водорослей усиливалось.

На поверхности клеток различных видов водорослей локализованы гидрофобные соединения, выполняющие защитную функцию. Содержание их у различных видов водорослей отличается более чем в 300 раз. Минимальное количество (0,01–0,06 % от сухой массы) обнаружено у представителей планктонных синезеленых водорослей, максимальное — у зеленых (0,36–3,43 %). Считают, что это является причиной наибольшей устойчивости зеленых водорослей к нефтепродуктам по сравнению с планктонными видами синезеленых.

2.3. Влияние поверхностно-активных веществ на фитопланктон

Синтетические поверхностно-активные вещества (СПАВ, детергенты) являются одним из основных компонентов загряз-

нения природных вод и входят в число опасных для окружающей среды ксенобиотиков. В зависимости от строения молекулы они могут включать такие соединения, как амины и их соли, амиды, жирные кислоты, меркаптаны и др. СПАВ используются главным образом как составная часть синтетических моющих средств (СМС).

Наличие в воде детергентов обуславливает появление у воды неприятного запаха и вкуса уже при концентрациях 1–3 мг/л при одновременном изменении цвета. СПАВ высокотоксичны для гидробионтов. Так, у рыб при концентрации СПАВ 0,5–1,5 мг/л повреждаются жаберные мембраны, концентрации 0,01–0,1 мг/л токсичны для олигохет и ракообразных. Летальная концентрация для планктона около 1 мг/л. Во многих работах отмечены морфологические изменения в колониях и ценобиях зеленых водорослей (деформация клеток, укрупнение размеров, зернистость, спорообразование, летальный исход). Так, у *Scenedesmus quadricauda* под воздействием СПАВ в ценобиях появлялись клетки с вогнутой формой и тенденцией к образованию разрывов между примыкающими клетками; обнаружены клетки, лишенные содержимого, очевидно за счет ускорения в неблагоприятных условиях образования и выхода автоспор.

Установлено, что СПАВ оказывают влияние на клеточные белки, вызывая их денатурацию, взаимодействуют с липидами клетки, нарушают осмотическое равновесие. Под их влиянием происходит изменение содержания хлорофилла в клетках и, как следствие, угнетение фотосинтетической функции; угнетается репродуктивная функция, увеличиваются траты кислорода на дыхательный процесс. СПАВ нарушают проницаемость клеточных мембран, в связи с чем увеличивается проникновение в клетки других токсикантов, присутствующих в водоеме, и, как следствие, повышается их аккумуляция и токсичность. При наличии СПАВ происходит эмульгирование имеющейся в воде нефти, что облегчает ее проникновение в клетки и также влечет возрастание токсичности. Разные типы СПАВ, попадая в водоемы, смешиваются друг с другом и с другими загрязнителями, зачастую усиливая токсический эффект друг друга во много раз.

С санитарно-гигиенической точки зрения одним из токсических проявлений СПАВ является пенообразование. В пене концентрируются микроорганизмы, сами СПАВ, другие органические соединения. Пена угнетает высшие водные растения, нарушает процессы фотосинтетической аэрации воды. Наличие детергентов в концентрации около 1 мг/л приводит к тому, что на реках с медленным и спокойным течением интенсивность аэрации понижается на 60 % и более. Снижается эстетическая ценность водных объектов и ограничиваются возможности их использования в рекреационных целях.

С другой стороны, загрязнение естественных водоемов СПАВ может приводить к эвтрофированию вследствие высокого содержания в них фосфора. В низкой концентрации эти загрязнители могут активизировать жизнедеятельность водорослей, провоцируя вспышки цветения.

2.3.1. Лабораторная работа 5

Изучение влияния СПАВ на микроводоросли

Цель работы: изучить влияние СПАВ на морфологическую изменчивость и выживаемость микроводорослей.

Задачи:

1. Поставить эксперимент по влиянию СПАВ на микроводоросли.
2. Освоить методику подсчета клеток водорослей в счетной камере Горяева.
3. Определить состояние культуры в конце эксперимента по сравнению с исходным, подсчитать число живых и мертвых клеток, процент гибели клеток.

Объект исследования: чистые или смешанные альгологические культуры р.р. *Scenedesmus*, *Chlorella*.

Реактивы:

1. Среда Прата.
2. Растворы синтетических моющих средств (СМС).

1. Характеристика объекта исследования

Для проведения эксперимента используют чистые культуры видов *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. или *Chlorella vulgaris* Beyer. (рис. 2).

Сценедесмус широко распространен в водных объектах России и имеет относительно крупные удлинненно-овальные клетки с закругленными концами. Клетки неподвижные, собранные в виде плоских пластинок (ценобии) по 2–4, реже 8–16 клеток. Боковые клетки ценобия несут на внешних углах по длинному, загнутому несколько кнаружи игловидному отростку или шипу, что является структурной характеристикой данного вида (рис. 2 А). Размер клеток 7–43 х 2,5–16 мкм. Каждая клетка имеет пластинчатый хлоропласт с пиреноидом и ядро, видимое после окраски. Размножение автоспорами. Автоспоры в материнской оболочке располагаются пучком, после освобождения разворачиваются в виде пластинки. В условиях культуры вместо ценобиев могут образовываться отдельные клетки.



Рис. 2. А — ценобий *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb.;
Б, В — *Chlorella vulgaris* Beyer.:

Б — вегетативная клетка, В — образование автоспор

Хлорелла распространена в водных объектах южных широт. Клетки одиночные, шаровидные, с тонкой оболочкой, без слизи. Хлоропласт чашевидный, с пиреноидом. Размножение автоспорами, образующимися по 4–8, реже 16 и освобождающимися через разрыв материнской оболочки (рис. 2 Б, В). Диаметр клеток 4,2–10,5 мкм.

2. Культивирование водорослей

Для культивирования используют среду Прата. Водоросли рекомендуется пересевать один раз в десять дней. Для этого в чистую стерильную колбу объемом 250 мл со свежей средой (100–150 мл) над пламенем спиртовки приливают примерно 15–20 мл верхнего ростового слоя из колбы ранее культивируемых водорослей. При этом получают начальную плотность клеток примерно 300 тыс. кл./мл. Колбу закрывают ватно-марлевой пробкой или фольгой, перемешивают и ставят в люминостат. Культивирование проводят при освещении 3 000–6 000 лк и температуре 20 ± 2 °С. Соблюдают световой суточный ритм. Культуру водорослей периодически перемешивают, встряхивая 1–2 раза в сутки. После пересева культур на новую среду экспоненциальная фаза роста наступает на 4 сутки. Плотность культуры в колбе в это время достигает примерно 5 млн кл./мл.

3. Постановка эксперимента

Для эксперимента можно использовать либо одно и то же СМС в разных концентрациях, либо СМС разного состава (например, содержащие анионные или неионогенные ПАВ или их комбинации) в одной и той же концентрации.

В контрольные и опытные колбы емкостью 250 мл наливают по 100 мл контрольной среды (контроль — **К**) или растворы СМС приготовленных концентраций (опыт — **О**). Контролем служит культуральная среда, на которой культивируются водоросли (среда Прата). Исследуемые концентрации СМС также готовят на культуральной среде.

Используют начальную плотность клеток 25 тыс. кл./мл. Нужная плотность клеток в опыте достигается расчетом исходя из объема пробы. Например, для пробы 100 мл и численности клеток в культуре в экспоненциальной фазе роста примерно 5 млн кл./мл в опытные и контрольные колбы добавляют по 0,5 мл трехсуточной культуры водорослей.

Колбы закрывают ватно-марлевыми пробками или фольгой, их содержимое тщательно перемешивают и помещают на экспозицию в люминостат. Повторность трехкратная.

По окончании времени экспозиции сначала отмечают визуально наблюдаемые изменения опытных культур по сравнению с контролем: изменение окраски, опускание на дно, гомогенность или агрегация и т. д. Затем культуры микроскопируют, отмечают морфологические изменения клеток и колоний по сравнению с контролем, проводят подсчет живых и мертвых клеток в счетной камере Горяева, определяют процент гибели клеток.

4. Подсчет клеток в камерах Горяева

Для учета количества клеток в суспензии водорослей используют специальные счетные камеры. Обычно используют камеру Горяева — Тома (рис. 3), хотя можно применять и другие. Камера Горяева представляет собой толстое предметное стекло, разделенное бороздками. На центральную часть стекла нанесена сетка (рис. 3 А, В). Площадь квадрата сетки указана на одной из сторон предметного стекла и соответствует $1/25 \text{ мм}^2$ (большой квадрат) или $1/400 \text{ мм}^2$ (малый квадрат).

Часть предметного стекла, на которой нанесена сетка, на 0,1 мм ниже двух других сторон (рис. 3 Б). Это глубина камеры; она всегда указывается на предметном стекле.

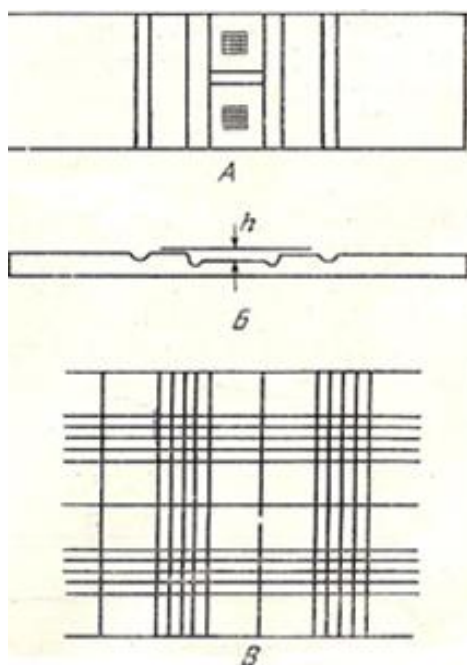


Рис. 3. Счетная камера Горяева — Тома:

А — вид сверху; Б — вид сбоку;

В — при малом увеличении микроскопа

При работе с камерой необходимо соблюдать определенный порядок ее заполнения. Вначале углубление с сеткой накрывают специальным шлифованным покровным стеклом и, слегка прижимая, смещают покровное стекло в противоположные стороны до появления колец Ньютона. Это указывает на то, что покровное стекло притерто к сторонам камеры. Только при таком условии объем жидкости, находящейся в камере, соответствует расчетному. После этого камеру заполняют исследуемой жидкостью. Ее вносят пипеткой через бороздку камеры. Подсчет клеток рекомендуется начинать через 3–5 мин после заполнения камеры, чтобы клетки осели и при микроскопировании были видны в одной плоскости.

Число клеток подсчитывают с объективом 8× или 40×. Обычно подсчитывают клетки в 10 больших или 20 маленьких квадратах сетки, перемещая их по диагонали. Учитывают все клетки, пересекающие верхнюю и правую стороны квадрата. При подсчете количество клеток в большом квадрате не должно превышать 20, а в малом — 10, в противном случае исходную жидкость разводят водопроводной водой. Для получения достоверного результата общее число подсчитанных клеток должно быть не менее 600.

Подсчет клеток повторяют 3–4 раза, каждый раз заново монтируя камеру и заполняя ее исследуемой жидкостью. Это обеспечивает большую точность, чем подсчет 600 клеток при однократном монтаже камеры. Количество клеток в 1 мл исследуемой жидкости вычисляют по формуле:

$$M = a_{\text{ср.}} \times 10^3 \times n / h \times S, \quad (14)$$

где M — число клеток в 1 мл (1 см^3); $a_{\text{ср.}}$ — среднее число клеток в квадрате сетки; 10^3 — коэффициент перевода мм^3 в см^3 ; n — разведение исследуемой жидкости; h — глубина камеры в мм; S — площадь квадрата сетки в мм^2 .

5. Подсчет живых и мертвых клеток

Для дифференциации клеток на живые и мертвые используют методику окрашивания водорослей с помощью красителей. В основе действия красителей лежат различия в проницаемости и адсорбции их живой или мертвой клеткой.

Для определения живых и мертвых клеток зеленых водорослей используют красители: метиленовый синий и нейтральный красный. К 1 мл суспензии водорослей добавляют по 1 мл метиленового синего и нейтрального красного в разведении 1:5 000. Растворы красителей и суспензии водорослей тщательно перемешивают и через 20 мин микроскопируют. При одновременной окраске метиленовый синий окрашивает мертвые клетки в синий цвет, у живых клеток происходит витальное окрашивание нейтральным красным в розовый цвет.

На основании проведенных подсчетов определяют процент гибели клеток в контрольном и опытном вариантах.

6. Оформление лабораторного журнала

1. Тема занятия.
2. Название лабораторной работы.
3. Цель и задачи работы.
4. Объект исследования.
5. Действующее вещество.

Указать, с каким СМС и в какой концентрации поставлен эксперимент.

6. Ход работы.

6.1. Подготовить культуры для проведения эксперимента и поставить их на экспозицию в соответствии с п. 3.

6.2. Приготовить временный препарат исходной культуры для микроскопирования. Используя световой микроскоп с объективом 40×, изучить и зарисовать строение колоний и клеток.

6.3. Провести окраску исходной культуры в соответствии с п. 5.

6.4. Через 20 мин приступить к подсчету клеток в камере Горяева в соответствии с п. 4.

При подсчете обязательно указывать число живых и мертвых клеток в каждом квадрате. По результатам подсчета определить общее число клеток в каждом квадрате, рассчитать средние значения живых, мертвых и общего числа клеток в квадрате. Полученные результаты занести в таблицу (табл. 3).

Таблица 3

Результаты подсчета клеток в счетной камере

№ квадрата	Число живых клеток, $a_{\text{жив.}}$	Число мертвых клеток, $a_{\text{мертв.}}$	Общее число клеток, $a_{\text{общ.}}$
1			
2			
....			
Итого n квадратов	Итого $\sum a_{\text{жив.}} =$	Итого $\sum a_{\text{мертв.}} =$	Итого $\sum a_{\text{общ.}} =$
	$a_{\text{жив. ср.}} =$ $= \sum a_{\text{жив.}} / n$	$a_{\text{мертв. ср.}} =$ $= \sum a_{\text{мертв.}} / n$	$a_{\text{общ. ср.}} =$ $= \sum a_{\text{общ.}} / n$

6.5. Рассчитать общее число клеток ($M_{\text{общ.}}$) и число погибших клеток ($M_{\text{мертв.}}$) в 1 мл, используя формулу 14.

6.6. Определить процент мертвых клеток по формуле:

$$\% \text{ мертвых клеток} = M_{\text{мертв.}} \times 100 / M_{\text{общ.}} \quad (15)$$

6.7. По окончании времени экспозиции повторить все действия, изложенные в п. 6.2 – 6.6, для контрольных и опытных колб.

Результаты занести в таблицу (табл. 4).

Таблица 4

Результаты определения морфологической изменчивости и выживаемости микроводорослей под влиянием СМС

Вариант	Визуальные наблюдения	Микроскопическая характеристика (рисунок и описание)	$M_{\text{общ.}}$, кл./мл	$M_{\text{мертв.}}$, кл./мл	% погибших клеток
Исходная культура					
Контроль					
СМС, мг/л концентрация 1					
СМС, мг/л концентрация 2					
СМС, мг/л концентрация 3					

6.8. По результатам работы сделать выводы о влиянии различных концентраций СМС (или одной и той же концентрации разных СМС) на морфологию и выживаемость культур водорослей.

Контрольные вопросы по теме 2

1. Что такое первичное и вторичное загрязнение водоемов? Какие загрязнители являются токсичными для водорослей?

2. Объясните понятия «эвтрофирование» и «цветение» водоемов, причины явлений.

3. Водоросли, вызывающие «цветение», их диагностические характеристики. Отрицательное значение явления. Методы борьбы.

4. Какая существует классификация водоемов в зависимости от трофности? Какие выделяют критерии оценки трофности?

5. Система Кольквитца и Марссона.

6. Водоросли как индикаторы степени загрязненности вод.

7. Участие водорослей в очистке природных вод. Минерализационная работа водорослей. Использование водорослей в очистке сточных вод на очистных сооружениях.

8. Каковы реакции водорослей на загрязнение водоемов тяжелыми металлами?

9. Опишите механизмы воздействия тяжелых металлов на клетки водорослей.

10. От чего зависит биологическая активность тяжелых металлов?

11. Какие особенности наличия тяжелых металлов в водоеме необходимо учитывать при установлении ПДК?

12. Что такое альгициды? Что вы знаете об их применении и механизме действия?

13. Опишите методику постановки эксперимента по изучению влияния ксенобиотиков (ТМ, СПАВ) на первичное продуцирование фитопланктона.

14. Каково влияние нефтепродуктов на первичную продукцию водорослей?

15. Опишите изменения, происходящие в клетках водорослей под влиянием СПАВ.

16. Каковы механизмы токсического действия СПАВ на клетки водорослей?

17. Опишите устройство счетной камеры Горяева и методику подсчета клеток водорослей.

18. Для чего при подсчете водорослей в счетных камерах проводят окрашивание клеток красителями? Какие используют красители?

Рекомендуемая литература

Основная

1. Анисимова, О. Экологические и географические характеристики водорослей-индикаторов / О. Анисимова, С. Барина, Л. Медведева // Водоросли-индикаторы в оценке качества окружающей среды. — М. : ВНИИ природы, 2000. — С. 60–150.

2. Вишняков, А. Н. Биодоступность ионов меди для водоросли хлорелла в водах различного происхождения / А. Н. Вишняков, Е. С. Стравинскене, Ю. С. Григорьев // Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы: материалы V Всероссийской конференции по водной экотоксикологии, посвященной памяти Б. А. Флерова. — Ярославль : Филигрань, 2014. — Т. 1. — С. 12–16. — URL : <http://ibiw.ru/index.php?p=conf&lang=ru>

3. Отклик пресноводных микроводорослей на воздействие различных нефтепродуктов / В. П. Гусейнова, А. В. Курейшев, Ю. В. Крылова, Е. А. Курашов // Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы: материалы III Всероссийской конференции по водной токсикологии памяти Б. А. Флерова. — Ярославль, 2008. — Ч. 2. — С. 221–225.

4. Воропаева, О. Г. Экологическая альгология с основами биоиндикации : текст лекций / О. Г. Воропаева. — Ярославль : ЯрГУ, 2009.

5. ГН 2.1.5.1315-03. Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования. С изм. от 28.09.2007. — URL : <http://www.gosthelp.ru/text/GN215131503Predelnodopust.html> (дата обращения : 05.10.2015).

6. МУ 2.1.5.800-99. Организация госсанэпиднадзора за обеззараживанием сточных вод. — URL : <http://docs.cntd.ru/document/1200029241> (дата обращения : 05.10.2015).

7. Нормативы качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативы предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения. Утв. приказом Росрыболовства от 18.01.2010 № 20. — URL : <http://docs.cntd.ru/document/902199367> (дата обращения : 05.10.2015).

8. МУ «О порядке разработки и утверждения нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения». Утв. приказом Росрыболовства от 04.08.2009 № 695. — URL : <http://docs.cntd.ru/document/902172637> (дата обращения : 05.10.2015).

9. СанПиН 2.1.4.1074-01. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. — URL : <http://docs.cntd.ru/document/901798042> (дата обращения : 05.10.2015).

Дополнительная

Будников, Г. К. Тяжелые металлы в экологическом мониторинге водных систем / Г. К. Будников // Соросовский образовательный журнал. — 1998. — № 5. — С. 23–29.

ТИТРИМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

1. СУЩНОСТЬ ТИТРИМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Титриметрический анализ основан на точном измерении количества реактива, израсходованного на реакцию с определяемым веществом.

Титрованный, или стандартный, раствор — раствор, концентрация которого (титр) известна с высокой точностью.

Титрование — прибавление титрованного раствора к анализируемому для определения точно эквивалентного количества.

Титрующий раствор часто называют рабочим раствором, или **титрантом**. Например, если иод титруют тиосульфатом натрия, то раствор тиосульфата натрия называется титрантом.

Момент титрования, когда количество прибавленного титранта химически эквивалентно количеству титруемого вещества, называется **точкой эквивалентности** (стехиометричности).

2. ОСНОВНЫЕ ПРИЕМЫ ТИТРОВАНИЯ

Метод **прямого титрования** — определяемое вещество непосредственно реагирует с титрантом.

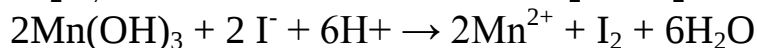
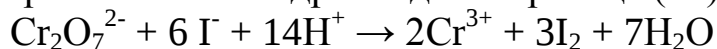
Метод **титрования заместителя** (титрование по замещению, косвенное титрование) — к определяемому веществу добавляют специальный реагент, вступающий с ним в реакцию. Один из продуктов взаимодействия затем оттитровывают рабочим раствором. Например, иодометрическое определение окислителей (растворенного в воде кислорода, ионов меди, железа и др.).

Известны и другие титриметрические методики анализа.

3. ИОДОМЕТРИЧЕСКОЕ ТИТРОВАНИЕ ПО ЗАМЕЩЕНИЮ

Используют для определения окислителей. Иодометрическое определение окислителей основано на окислении иодид-иона и титровании выделившегося иода тиосульфатом натрия.

Примерами реакций этого типа являются реакция иодида с бихроматом или гидроксидом марганца (III):



Выделившийся I_2 окисляет ион $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ в соответствии с реакцией:

$$\text{I}_2 + \text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow 2 \text{I}^- + \text{S}_4\text{O}_6^{2-}$$

Трофический статус водных объектов по характеристикам фитопланктона

Критерий	Тип трофии				Источник
	Олиго- трофный	Мезо- трофный	Эв- трофный	Гипер- трофный	
Валовая продукция фитопланктона за год, г С/м ²	10–30 4–40	30–100 40–150	100–300 150–600	> 300 > 600	Винберг, 1960 Романенко, 1985
Продукция фитопланктона, мг С/л сут.	0,005–0,05	0,05–0,5	0,5–5	> 5	Гутельмахер, 1986
Максимальная первичная продукция за сутки г С/м ² г О/м ² г О/м ²	0,1–0,3 0,5–1,0 < 1,22	0,3–0,7 1,0–2,5 1,23–2,22	0,7–2,01 2,5–7,5 2,23–6,40	> 2,0 > 7,5 > 6,40	Винберг, 1960 Тот же Сиротский и др., 2011
Чистая первичная продукция, мг С/м ² сут.	50–300	250–1 000	600–8 000	> 8000	Likens, 1975
Концентрация хлорофилла "а", мкг/л	0,1–1,0 0,1–1,0 < 4,0 6–16 < 3	1–10 1–10 4–10 16–60 4–8	10–100 > 10 10–100 > 60 9–60	> 100 – > 100 – > 60	Винберг, 1960 Бульон, 1983 Henderson — Selers, 1984 Цветкова и др., 1988 Сиротский и др., 2011
Скорость фотосинтеза, мг О/л сут	07–10	1,0–2,4	> 2,4	–	Цветкова, 1988
Численность фитопланктона, млн кл./л	0,35–3,85	3,85–20	> 20	–	Тот же
Отношение концентраций N: P	30–40	25–30	15–25	12–15	Алекин, 1985

**Определение объемов проб воды
для определения хлорофилла *a***

Концентрация хлорофилла <i>a</i> в пробе, мкг/л	Объем пробы, л
0,05	> 40
0,1	> 20 до 40 включ.
0,5	> 4 до 20 включ.
5,0	> 0,4 до 4 включ.
50,0	> 0,2 до 0,4 включ.
100,0	> 0,02 до 0,2 включ.

Приведенные объемы проб рассчитаны исходя из оптимального диапазона оптических плотностей экстракта на длине волны 664 нм (0,005–0,8 относительных единиц). Если относительные единицы оптической плотности экстракта будут превышать значения 0,8, то экстракт следует разбавить этанолом в два раза и провести повторное измерение на приборе. В этом случае при расчете хлорофилла *a* необходимо учесть примененное разбавление.

Ориентировочные соотношения между количеством хлорофилла *a* в экстракте, длиной кюветы *I*, объемом экстракта в кювете *V*, концентрацией хлорофилла *a* в экстракте *X* и оптической плотностью *D*₆₆₄

Количество хлорофилла <i>a</i> в экстракте, мкг	Параметры			
	<i>I</i> , см	<i>V</i> , см ³	<i>X</i> , мкг/см ³	<i>D</i> ₆₆₄
2	1	4	0,500	0,050
	2	8	0,250	
	5	20	0,100	
5	1	4	1,250	0,125
	2	8	0,625	
	5	20	0,250	
10	1	4	2,500	0,250
	2	8	1,250	
	5	20	0,500	
20	1	4	5,000	0,500
	2	8	2,500	
	5	20	1,000	

**Предельно допустимые концентрации (мг/л) содержания
некоторых тяжелых металлов в воде водоемов,
принятые в России**

ТМ	Показатели качества воды			
	Источник	Норматив	ЛПВ	Класс опасности
Кадмий (Cd^{2+})	ГН	0,001	сан.-токс.	2
	СанПиН	0,001	сан.-токс.	2
	Рыбохоз.	0,005	токс.	2
Медь (Cu^{2+})	ГН	искл.	—	—
	СанПиН	1	орг. (привк.)	3
	Рыбохоз.	0,001	токс.	3
Никель (Ni)	ГН	0,02	сан.-токс.	2
	СанПиН	0,1	сан.-токс.	3
	Рыбохоз.	0,01	токс.	3
Ртуть (Hg)	ГН	0,0005	сан.-токс.	1
	СанПиН	0,0005	сан.-токс.	1
	Рыбохоз.	0,00001	токс.	1
Свинец (Pb)	ГН	0,01	сан.-токс.	2
	СанПиН	0,03	сан.-токс.	2
	Рыбохоз.	0,006	токс.	2
Хром (Cr^{6+})	ГН	0,05	сан.-токс.	3
	СанПиН	0,05	сан.-токс.	3
	Рыбохоз.	0,02	токс.	3
Цинк (Zn)	ГН	1	общ.	3
	СанПиН	5	орг. (привк.)	3
	Рыбохоз.	0,01	токс.	3

Условные обозначения:

ГН — ГН 2.1.5.1315-03; **СанПиН** — СанПиН 2.1.4.1074-01; **Рыбохоз.** — ПДК для воды объектов, имеющих рыбохозяйственное значение [Нормативы ... 2010]; **ЛПВ** — лимитирующий показатель вредности: токс. — токсикологический (прямое

токсическое действие веществ на водные биологические ресурсы); сан.-токс. — санитарно-токсикологический (действие вещества на биологические объекты и санитарные показатели водных объектов); орган. — органолептический (привк. — привкус); общ. — общий.

Классы опасности: 1 — чрезвычайно опасные; 2 — высокоопасные; 3 — опасные; 4 — умеренно опасные.

МЕТОДИКИ ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАКТИВОВ

1. Реактивы Винклера

Приготовленные реактивы хранят в темных склянках.

А. Щелочной раствор иодида калия KJ

10 г KJ растворить в 100 мл дистиллированной воды и в этом же объеме растворить 32 г NaOH (или 48 г KOH).

Б. Хлорид марганца $MnCl_2$ 32 %-й раствор

Для приготовления 100 г раствора 32 г $MnCl_2$ растворить в 68 мл дистиллированной воды, перемешать до полного растворения.

2. Серная кислота H_2SO_4 разбавленный раствор 1 : 1

При приготовлении растворов кислот работать под вытяжкой, в термостойкой посуде, использовать перчатки!

Для приготовления 500 г раствора к 250 мл дистиллированной воды добавить 250 мл концентрированной H_2SO_4 .

3. Серная кислота H_2SO_4 25 %-й раствор

Для приготовления 500 г раствора к 422 мл дистиллированной воды добавить 78 мл концентрированной H_2SO_4 ($d=1,84$; 98 %).

4. Соляная кислота HCl 0,5 М раствор

(по РД 52.24.784-2013)

3,0 мл концентрированной HCl с удельным весом 1,19, внести в мерную колбу вместимостью 250 мл и довести до метки дистиллированной водой. Аккуратно перемешать.

5. Тиосульфат натрия $Na_2S_2O_3$ 0,01 н раствор

Желательно готовить из фиксаля. При его отсутствии 2,481 г $Na_2S_2O_3$ внести в мерную колбу вместимостью 1 л и довести до метки дистиллированной водой.

На каждое занятие готовят свежий раствор. Хранят в темных склянках.

6. Двуххромовокислый калий (хромпик) $K_2Cr_2O_7$ 0,01 н раствор

0,4904 г $K_2Cr_2O_7$, взвешенного с точностью до $\pm 0,0002$ г, перекристаллизованного и высушенного при $180^\circ C$ до постоянной массы, внести в мерную колбу вместимостью 1 л и довести до метки дистиллированной водой.

7. Иодид калия KJ 15 %-й раствор

Для приготовления 100 г раствора 15 г KJ растворить в 85 мл дистиллированной воды, перемешать до полного растворения.

8. Крахмал 0,2 %-й раствор

Навеску крахмала 0,2 г растворить в 5 мл холодной воды. Вскипятить 95 мл дистиллированной воды в термостойком стакане, влить растворенный крахмал. Перемешать, охладить на воздухе.

На каждое занятие готовят свежий раствор.

9. Среда Прата для культивирования микроводорослей, г/л:

KNO_3 — 0,1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ — 0,01;
 $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,001.

Оглавление

Введение	3
Тема 1. Первичная продукция водоемов и методы ее определения	6
1.1. Основные понятия и определения	6
1.2. Кислородная модификация скляночного метода определения первичной продукции водоемов (кислородный метод).....	9
1.2.1. Лабораторная работа 1	11
Определение первичной продукции фитопланктона кислородным методом	11
1.3. Радиоуглеродная модификация скляночного метода определения первичной продукции водоемов (радиоуглеродный метод)	18
1.4. Хлорофилльный метод определения первичной продукции водоемов.....	19
1.4.1. Лабораторная работа 2	21
Определение первичной продукции фитопланктона хлорофилльным методом.....	21
Контрольные вопросы по теме 1	26
Рекомендуемая литература	28
Тема 2. Экспериментальная оценка влияния токсических веществ на фитопланктон.....	29
2.1. Влияние загрязнения водоемов тяжелыми металлами на фитопланктон	33
2.1.1. Лабораторная работа 3–4 Изучение влияния тяжелых металлов на микроводоросли.. в остром и хроническом экспериментах	37
2.2. Влияние нефтепродуктов на первичную продукцию пресноводных водорослей	42
2.3. Влияние поверхностно-активных веществ на фитопланктон	43
2.3.1. Лабораторная работа 5	45
Изучение влияния СПАВ на микроводоросли	45
Контрольные вопросы по теме 2	52
Рекомендуемая литература	53
Приложения	55

Учебное издание

**Большой практикум.
Продукция фотосинтеза**

Учебно-методическое пособие

Составитель

Кондакова Галина Вячеславовна

Редактор, корректор М. Э. Левакова

Верстка М. Э. Леваковой

Подписано в печать 07.10.15. Формат 60×84 1/16.

Усл. печ. л. 3,72. Уч.-изд. л. 2,5.

Тираж 40 экз. Заказ

Оригинал-макет подготовлен
в редакционно-издательском отделе ЯрГУ.

Ярославский государственный университет
им. П. Г. Демидова.

150000, Ярославль, ул. Советская, 14.