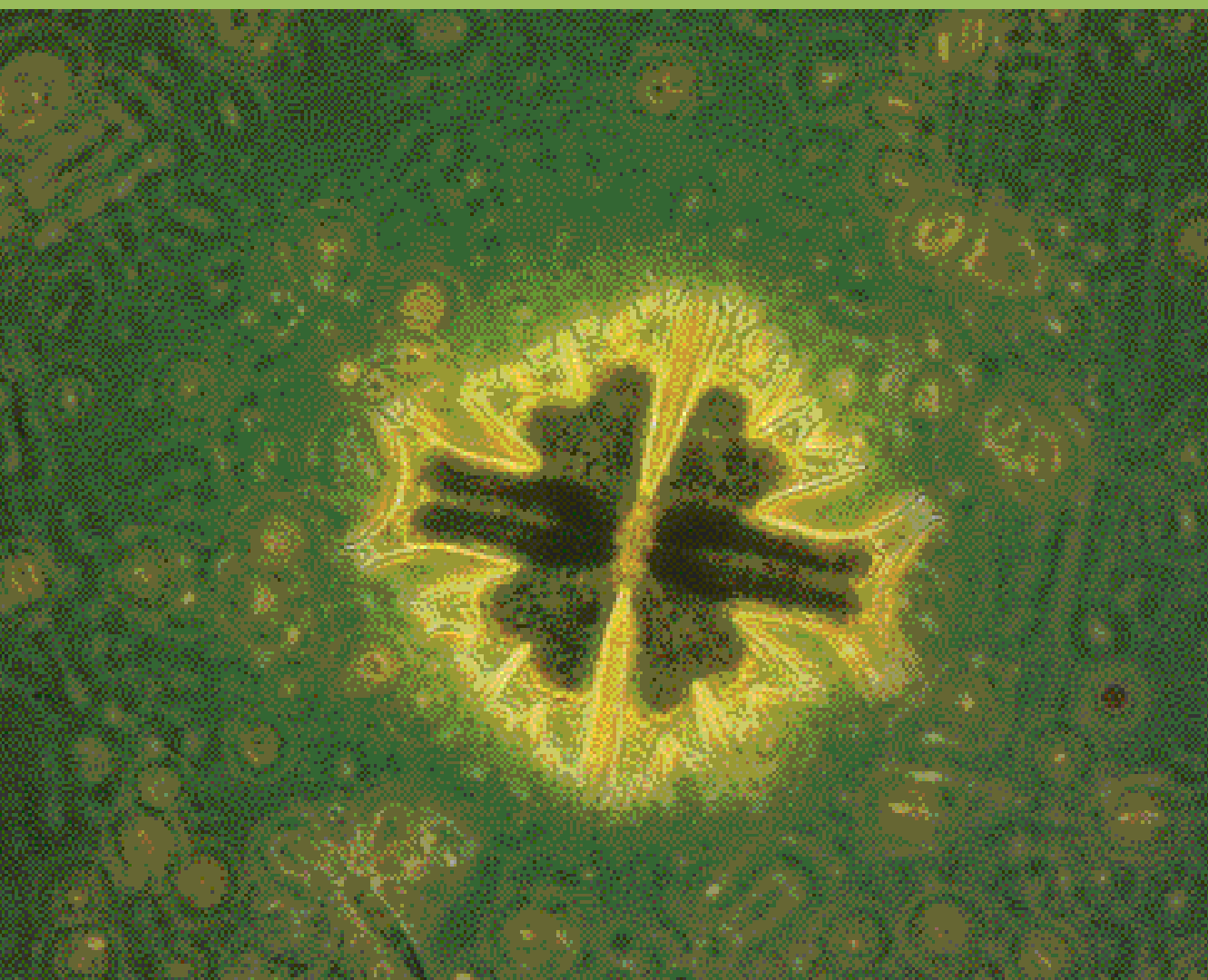


YMPÄRISTÖOPAS

Биологические методы исследования водоемов в Финляндии

Редакция: Марья Руоппа и Пертти Хейнонен



YMPÄRISTÖOPAS

Биологические методы исследования водоемов в Финляндии

Редакция: Марья Руоппа и Пертти Хейнонен

Helsinki 2006

SUOMEN YMPÄRISTÖKESKUS



S Y K E

YMPÄRISTÖOPAS
Suomen ympäristökeskus

Taitto: Terttu Saari
Kansikuva: Johanna Issakainen, koristelevä Micraterias

Julkaisu on saatavana myös internetistä:
www.ymparisto.fi/julkaisut

Edita Prima Oy, Helsinki 2006

ISBN 952-11-2449-0 (nid.)
ISBN 952-11-2450-4 (PDF)
ISSN 1238-8602 (pain.)
ISSN 1796-167X (verkkoj.)

Вступительное слово

Данное издание является результатом сотрудничества российских и финских специалистов, работающих в области исследований состояния окружающей среды. Биологические методы изучения и мониторинга состояния водоемов уже в течение нескольких десятилетий активно применяются в России и Финляндии. В двух странах собрано достаточно много информации. Весьма актуальным вопросом является использование результатов биологических исследований в мониторинге, а также и их сопоставление с результатами физико-химических методов.

Заметим, что в настоящее время лишь часть методик и тестов стандартизирована. В условиях особенностей законодательства Финляндии биологические методы имеют важное прикладное значение. Значение биологических методов увеличилось в связи с требованиями и реализацией положений Рамочной Директивы Европейского Союза по водной политике.

В России также есть свои давние традиции в области гидробиологии. Есть надежда и на то, что методы мониторинга в России будут приближаться к европейским. Тогда у будущих исследователей появится возможность сравнивать материалы исследований водоемов в Республике Карелия и Финляндии.

Перед Вами незначительно сокращенный перевод на русский язык публикации: Suomessa käytetyt biologiset vesitutkimusmenetelmät, (Toim. Marja Ruoppa ja Pertti Heinonen), Suomen ympäristö nro 682, 2004. Оригинальный текст можно найти в системе Интернет по адресу: www.ymparisto.fi/julkaisut.

Подчеркнем, что данная публикация не является детальным описанием всех биологических методов исследований водоемов. Перед ней стояла более скромная задача – потребовалось выполнить краткое описание современных методик, а также и описать биологические тесты. Все, кто интересуются подробностями методик, тестов и стандартов могут воспользоваться многочисленными ссылками, приведенными в тексте.

Все работы, связанные с переводом и изданием этой публикации, финансировало Министерство окружающей среды Финляндии. Исполнителями проекта со стороны Финляндии были Ханну Луотонен, Тимо Хокканен и Леена Лехикойнен из Центра окружающей среды Северной Карелии и Паули Хайми из Центра окружающей среды Юго-Восточной Финляндии. Координатором работ со стороны России был Евгений Иешко – заместитель председателя Президиума Карельского научного центра РАН.

В подготовке издания приняли участие многие специалисты из Финляндии и России. Первый перевод на русский язык подготовила Татьяна Титова (Петрозаводск). 11.04.2006 в Карельском научном центре состоялось рабочее совещание, на котором было принято решение о продолжении сотрудничества по подготовке издания на русском языке. Много внимания было уделено обсуждению статуса методик и тестов.

Паули Хайми (Коуволла) выполнил редакцию текста на русском языке. Российские специалисты полностью проверили содержание издания, а также дополнили его своими комментариями. В этой работе приняли участие: Наталия Калинкина, Мария Сярки, Александр Рябинкин, Андрей Шаров и Юлия Шарова – специалисты лаборатории гидробиологии Института водных проблем Севера КарНЦ РАН, а также Станислав Китаев и Сергей Комулайнен – ученые Института биологии КарНЦ РАН. Техническое и научное редактирование публикации на русском языке выполнили Л. В. Кабанова и М. А. Радостина, сотрудники редакционно-издательского отдела КарНЦ РАН.

Вся работа по подготовке публикации была выполнена очень быстро – весной и летом 2006 года. Мы благодарим всех участников этого небольшого проекта. Надеемся, что публикация будет полезна специалистам и студентам-экологам.

Хельсинки 15.11.2006

Пертти Хейнонен
Марья Рууппа
Ханну Луотонен
Евгений Иешко

СОДЕРЖИМОЕ

Оглавление.....	3
1 Введение	9
2 Биологические методы исследований и оценки состояния водоемов	10
2.1 Общие сведения	10
2.2 ФИТОПЛАНКТОН (Лийса Леписто, Институт окружающей среды Финляндии)	11
2.2.1 Анализ фитопланктона	11
2.2.2 Отбор проб.....	12
2.2.3 Изучение проб под микроскопом.....	12
2.3 Определение концентрации хлорофилла «а» в воде.....	14
2.4 Первичная продукция.....	15
2.4.1 Общие сведения	15
2.4.2 Определение первичной продукции in situ.....	16
2.4.3 Способность к первичной продукции	16
2.5 Зоопланктон (Йоуко Сарвала, университет Турку)	17
2.5.1 Общие сведения	17
2.5.2 Отбор проб.....	18
2.5.3 Обработка проб в лаборатории	20
2.6 Перифитон.....	24
2.6.1 Общие сведения (Пертти Элоранта, Хельсинкский университет)	24
2.6.2 Определение перифитона на естественных субстратах	25
2.6.2.1 Методы	25
2.6.2.2 Принцип.....	25
2.6.2.3 Область применения метода	26
2.6.2.4 Макроскопические водоросли	26
2.6.2.5 Микроскопические водоросли	27
2.6.3 Диатомовые водоросли (Пертти Элоранта, Хельсинкский университет)	29
2.6.3.1 Общие сведения	29
2.6.3.2 Выбор места исследований	31
2.6.3.3 Время проведения исследований	32
2.6.3.4 Выбор субстрата	32
2.6.3.5 Отбор проб с камней	33
2.6.3.6 Лабораторная обработка	34
2.6.4 Определение перифитона на искусственных субстратах (Сирпа Херве, Центр окружающей среды Центральной Финляндии, Пертти Хейнонен, Институт окружающей среды Финляндии)	36

2.6.4.1	<i>Общие сведения</i>	37
2.6.4.2	<i>Оборудование</i>	37
2.6.4.3	<i>Инкубация</i>	39
2.6.4.4	<i>Анализ проб</i>	39
2.6.5	Образование слизи на экспериментальной сети (Сирпа Херве, Центр окружающей среды Центральной Финляндии и Пертти Хейнонен, Институт окружающей среды Финляндии)	40
2.6.5.1	<i>Общие сведения</i>	40
2.6.5.2	<i>Оборудование</i>	41
2.6.5.3	<i>Инкубация</i>	41
2.6.5.4	<i>Анализ проб</i>	42
2.7	Исследование водной растительности	43
2.7.1	Общие сведения	43
2.7.2	Методы	44
2.8	Исследование зообентоса (Эса Коскенниэми, Центр окружающей среды Западной Финляндии, Марья Рууппа, Институт окружающей среды Финляндии)	46
2.8.1	Общие сведения	46
2.8.2	Места отбора проб	47
2.8.3	Отбор проб	48
2.8.4	Лабораторные анализы	49
3	Биологические тесты	52
3.1	Общие сведения	52
3.2	Опыт инкубирования фитопланктона (Олли-Пекка Пизтиляйнен, Институт окружающей среды Финляндии)	52
3.2.1	Общие сведения	52
3.2.2	Опыт инкубирования в лабораторных условиях (тест AGP)	53
3.2.3	Опыт с добавкой питательного раствора	53
3.3	Определение биологически пригодного фосфора – тест с использованием водорослей (Петри Экхольм, Институт окружающей среды Финляндии)	54
3.3.1	Общие сведения	54
3.3.2	Принцип теста	55
3.3.3	Оборудование для проведения теста	56
3.3.4	Проведение теста	56
3.4	Седиментация (Анна-Стийна Хейсканен, Институт окружающей среды Финляндии, Объединенный научный центр)	57
3.4.1	Общие сведения	57
3.4.2	Метод	58
3.4.3	Факторы, влияющие на результат	59
3.4.4	Трактовка результатов	59
3.5	Метод исследования водного мха	60
3.5.1	Общие сведения	60
3.5.2	Метод пересадки	61

3.6	Метод исследования личинок ручейниц (водных бабочек)	62
3.6.1	Общие сведения	62
3.6.2	Методы	63
4	Исследования токсичности – экотоксикология	64
4.1	Введение	64
4.2	Краткосрочные тесты одного вида	65
4.2.1	Общие сведения	65
4.2.2	Тесты с использованием бактерий (Маарит Приха, Ekolab, Юкка Ахтиайнен, Институт окружающей среды Финляндии)	66
4.2.2.1	<i>Световой бактериологический тест</i>	66
4.2.2.2	<i>Бактериологический тест Pseudomonas putida</i>	68
4.2.2.3	<i>Снижение потребления кислорода в активном иле ...</i>	69
4.2.2.4	<i>Снижение скорости размножения микроорганизмов в активном иле</i>	70
4.2.3	Тесты на беспозвоночных (Маарит Приха, Ekolab)	71
4.2.3.1	<i>Тесты на дафниях / ветвистоусых рачках</i>	71
4.2.4	Тесты с использованием водорослей (Маарит Приха, Ekolab)	72
4.2.4.1	<i>Тесты с использованием водорослей в пресных водоемах</i>	72
4.2.5	Тесты на рыбах (Тарья Накари, Институт окружающей среды Финляндии)	73
4.2.5.1	<i>Тест на рыбе Danio rerio</i>	73
4.2.6	Тест Lemna (Эйя Шульц, Институт окружающей среды Финляндии)	74
4.2.7	Тесты на генотоксичность и мутагенность	76
4.2.7.1	<i>Тест Umi</i>	76
4.2.7.2	<i>Тест Salmonella</i>	77
4.2.8	Наборы для проведения биотестов (Аннели Йоутти и Эйя Шульц, Институт окружающей среды Финляндии)	77
4.3	Долгосрочные тесты одного вида	80
4.3.1	Общие сведения	80
4.3.2	Тест на размножение дафний (Хейкки Тансканен, Центр окружающей среды региона Северное Саво)	81
4.3.3	Тест с использованием икры и мальков рыб (Тарья Накари, Институт окружающей среды Финляндии)	82
4.3.3.1	<i>Определение уровня токсичности путем тестирования икры и мальков рыб</i>	82
4.3.3.2	<i>Другие тесты</i>	83
4.3.4	Методы, основанные на изучении физиологии рыб (Юкка Тана; Марья Руоппа, Институт окружающей среды Финляндии)	84
4.3.4.1	<i>Общие сведения</i>	84
4.3.4.2	<i>Методики исследований</i>	84
4.3.4.3	<i>Исследуемые параметры</i>	84
4.3.4.4	<i>О применении методов</i>	85

4.4	Тесты с использованием нескольких биологических видов – модельные экосистемы	85
4.4.1	Общие сведения	85
4.4.2	Лабораторные анализы или микрокосмосы	86
4.4.3	Крупные модели экосистем или мезокосмосы	86
4.5	Измерение токсичности донных отложений (Юсси Кукконен, университет Йёнсуу)	87
4.5.1	Общие сведения	87
4.5.2	Отбор проб, их хранение, описание и обработка	87
4.5.3	Другие рекомендации по проведению теста	89
5	Биоаккумуляция	90
5.1	Общие сведения	90
5.2	Тест на биоаккумуляцию (Тарья Накари, Институт окружающей среды Финляндии)	90
5.3	Коэффициент деления октанол / вода (Тарья Накари, Институт окружающей среды Финляндии)	91
5.4	Метод выращивания двусторчатых моллюсков в садках (Сирпа Херве, Центр окружающей среды Центральной Финляндии)	92
5.4.1	Общие сведения	92
5.4.2	Отбор моллюсков для опытов	92
5.4.3	Очистка аквариумов и уход за моллюсками в лаборатории	93
5.4.4	Полевой этап в разведении моллюсков	94
5.4.5	Анализ моллюсков	94
6	Разложение (деструкция) химических соединений в биологических процессах (Юкка Ахтиайнен, Институт окружающей среды Финляндии)	96
6.1	Общие сведения	96
6.1.1	Биологическое разложение	96
6.1.2	Принципы тестирования биологического разложения	98
6.1.3	Наиболее распространенные тесты	100
6.1.3.1	<i>Методы OECD – Организации по экономическому сотрудничеству и развитию в Европе (1995)</i>	100
6.1.3.2	<i>ISO- standards</i>	101
7	Отбор проб	102
8	Контроль качества	104
	Резюме	108

1 Введение

Оценка состояния водоемов предполагает проведение обширного комплекса исследований и наблюдений. Методы, применяемые в лимнологии, подразделяются на гидрохимические, биологические и микробиологические. С помощью биологических методов исследований изучают биологические явления и процессы, происходящие в водной экосистеме. Физико-химические методы позволяют получить сведения об абиотической / неживой части экосистемы, а результаты многочисленных микробиологических методов характеризуют санитарно-гигиеническое состояние водоемов.

Руководство, представленное читателю на русском языке, является сокращенной версией издания на финском языке [Методы исследования водоемов, используемые в Финляндии (составители: М. Руоппа и П. Хейнонен) Suomen ympäristö 682, 2004]. При сокращении текста были удалены некоторые моменты, касающиеся исключительно особенностей Финляндии, а также ссылки на некоторые издания на финском языке.

В руководстве представлены наиболее важные и широко используемые в Финляндии методы и стандарты, а также биологические методы, пока не прошедшие процедуру стандартизации. Подробности методик следует искать в текстах утвержденных стандартов, а также и в соответствующих литературных источниках. Именно поэтому уже используемые стандартные методики не описаны в данном руководстве в деталях. Особое внимание привлечено к методам, пока не имеющим статуса стандартных.

The Finnish Environment Institute (SYKE) : www.ymparisto.fi

The Finnish Institute of Marine Research (FIMR): www.fimr.fi

HELCOM: www.helcom.fi

OECD: www.oecd.org

CEN: www.cenorm.be

ISO: www.iso.ch

2 Биологические методы исследований и оценки состояния водоемов

2.1

Общие сведения

Несколько директив Европейского Союза определяют систему мероприятий по охране поверхностных водоемов в настоящее время. В отношении качества воды наиболее важной является директива Европейского Парламента и Совета Европы – «Рамочная директива по водной политике», вступившая в силу в декабре 2000 года (Water Framework Directive/WFD).

В приложении номер V «Рамочной Директивы по водной политике» указаны биологические факторы и параметры, принимаемые во внимание при оценке состояния водоемов:

- При классификации рек учитываются следующие биологические факторы и параметры:
 - видовой состав водной флоры, параметры и соотношения численности видов;
 - видовой состав, параметры и соотношение численности видов зообентоса, а также видовой состав, параметры численности видов и возрастной состав рыб.

- При классификации озер учитываются следующие параметры, связанные с качеством воды:
 - видовой состав, параметры и соотношения численности видов и биомасса фитопланктона;
 - видовой состав, параметры и соотношения численности видов другой водной флоры;
 - видовой состав, параметры и соотношения численности видов зообентоса, а также видовой состав, параметры и соотношения численности видов, возрастной состав видов рыб.

- При классификации речных эстуариев необходимо учитывать следующие факторы и параметры:
 - видовой состав, параметры и соотношения численности видов и биомасса фитопланктона;
 - видовой состав, параметры и соотношения численности видов другой водной флоры;
 - видовой состав, параметры и соотношения численности видов зообентоса, а также видовой состав, параметры и соотношения численности видов и возрастной состав видов рыб.

- При классификации морских прибрежных акваторий учитываются следующие параметры:
 - видовой состав, параметры и соотношения численности и биомасса фитопланктона;
 - видовой состав, параметры и соотношения численности другой водной флоры, а также видовой состав, параметры и соотношения численности видов зообентоса.

Далее приведено описание методов исследований и мониторинга экологического состояния водоемов, применяемых в Финляндии.

2.2

Фитопланктон

Лийса Леписто, Институт окружающей среды Финляндии (liisa.lepisto@ymparisto.fi)

2.2.1

Анализ фитопланктона

В Финляндии, начиная с 1950-х годов, ведутся работы по классификации качества воды водоемов на основе результатов анализа видового состава и биомассы фитопланктона. Фитопланктон является основным биологическим звеном водоема, которое «несет ответственность» за продукцию органических веществ, за формирование режима кислорода, является источником питания для других обитателей водоема. Фитопланктон – важнейший элемент в микробиологическом цикле веществ. Период жизни видов фитопланктона является относительно непродолжительным, поэтому фитопланктон быстро реагирует на изменения качества воды. В случае изменений в условиях состояния окружающей среды изменения можно зафиксировать в видовом составе фитопланктона, в численности и биомассе, а также и в параметрах разнообразия видов. В худшем варианте указанные отклонения могут проявиться в виде массового цветения

водорослей, которое сопровождается образованием токсичных соединений, а также приводит к изменениям вкусовых качеств рыбы и воды.

Изучение видового состава и биомассы фитопланктона в рамках государственного мониторинга качества воды в Финляндии началось в 1963 году. С тех пор количество станций или мест отбора проб воды увеличилось от 90 до 400. Сегодня результаты исследований фитопланктона могут быть с успехом использованы при изучении процесса эвтрофирования водоемов, а также при определении токсичного воздействия сточных вод, сбрасываемых в водоемы.

2.2.2

Отбор проб

Пробы фитопланктона отбирают на достаточном удалении от берега для того, чтобы избежать попадания водорослей из прибрежной зоны. Как правило, пробы отбирают в глубоководной части озера, чаще всего – на открытом водном пространстве. Пробу отбирают с разных бортов лодки или катера, например, батометром Рутнера. Пробы фитопланктона во внутренних водоемах отбирают в слое воды от 0 до 2 м (в некоторых исследованиях 0–4 м), при этом 50-сантиметровым батометром последовательно с разной глубины поднимаются четыре пробы. Параллельно с отбором проб измеряют и фиксируют температуру в указанных слоях воды.

Интегральная (суммарная) проба воды помещается в большую пластиковую емкость. Рекомендуется использовать пластмассовое 20–30-литровое ведро с крышкой. Крышка защитит пробы от воздействия прямого солнечного света. Пробы перемешивают ковшом и разливают в стеклянные колбы с узким горлышком, куда заранее наливают раствор Люголя (0,5 мл/ 200 мл пробы). Рекомендуется использовать именно стеклянные колбы, так как применяемый в качестве фиксатора раствор Люголя испаряется из пластиковых бутылок. Прозрачное стекло для колб предпочтительнее темного: сквозь него можно следить за наличием фиксатора. Для более надежного закрепления в пробы добавляют по 2 мл 16%-ного формалина на каждые 200 мл. Колбы с образцами хранят в темноте при температуре ниже 18 °С. Если во время хранения проба обесцвечивается, то в нее добавляют раствор Люголя.

Из указанной интегральной пробы отбирают воду и для определения концентрации хлорофилла «а». Для проверки видового состава рекомендуется пропустить остатки пробы (около 20 мл) через планктонную сеть (ячейка 10–20 μm). Когда речь идет об отборе пробы для мониторинга, она из планктонной сети фиксируется раствором Люголя (1 капля на 20 мл пробы).

2.2.3

Изучение проб под микроскопом

Образцы можно анализировать на трех уровнях в зависимости от цели применения. Два первых уровня применяются в случае мониторинговых работ и тогда определяют количество и качество (видовой состав) фитопланктона. Третий уровень анализа

применяют при таксономических исследованиях. Данная методика была разработана в результате сотрудничества специалистов северных стран.

Уровни определений:

- Уровень I = зафиксированные раствором Люголя пробы для определения биомассы (количественная проба). В этом случае специальных исследований видового состава не выполняют.
- Уровень II = используются две пробы: одна – для определения биомассы, зафиксированная раствором Люголя, и другая – зафиксированная формалином и отобранная с помощью планктонной сети. Ее можно использовать в специальных препаратах для определения основных видов под обычным /оптическим микроскопом.
- Уровень III = живой материал, которым дополняют пробы для определения биомассы. В этом случае делают все возможные препараты, а также и дополнительные определения видов с использованием электронного микроскопа и в случае необходимости выполняют посев некоторых видов фитопланктона.

На I и II-м уровнях живой материал не используют, поэтому не всегда удастся выполнить полный анализ видого состава. В некоторых случаях требуется составить только список видов, тогда говорят, что пробы исследуются качественным и полуколичественным методом. В этом случае количество отдельных видов характеризуется по шкале от «очень бедный / малочисленный» (1) до «очень богатый / многочисленный» (5).

Пробы, отбираемые для программ мониторинга, обязательно следует консервировать, так как их, как правило, перевозят на большие расстояния. Зафиксированный образец изучается под световым микроскопом с применением прибора Утермеля. Перед началом исследования образец тщательно встряхивается, а затем, в зависимости от количества пробы, отстаивается в течение 1–24 часов в темноте.

Изучение пробы начинают с проверки видового состава. После отстаивания образец исследуют под микроскопом дважды с различным увеличением. Проба нанопланктона (размер ячейки 20–50 μm) оценивается под световым микроскопом при увеличении $\times 800$ – $\times 1200$ с 50–100 зрительных позиций / секторов в кювете. При данном увеличении размер определяемых видов изменяется от 2–20 до 50 μm . Более крупные, ранее незамеченные виды, изучаются при увеличении $\times 200$, чаще всего по нескольким зрительным позициям. Можно исследовать и всю поверхность кюветы, тогда будут учтены самые крупные таксоны, например *Ceratium*.

Литература

- Blomqvist, P. and Herlitz, E. 1998. Methods for quantitative assessment of phytoplankton in freshwaters, Part 2. Naturvårdsverket, Svensk Miljöovervakning, Rapport 4861. 78 pp.
- Heinonen, P. 1980. Quantity and composition of phytoplankton in Finnish inland waters. Publ. Water Res. Inst. 37. 91 pp.
- HELCOM, Manual for Marine Monitoring in the COMBINE programme of Helcom. 2002. Annex 6, Phytoplankton species composition, abundance and biomass. 21 pp.
- Järnefelt, H. 1952. Plankton als indikator der trophiegruppen der seen. Ann. Acad. Scient. Fenn. A. IV (18): 1–29.
- Komarek, J. and Anagnostidis, K. 1999. Cyanoprocaryota 1. Teil: Chroococcales. Susswasserflora von Mitteleuropa 19/1. Jena. 548 pp.
- Lepistö, L. 1999. Phytoplankton assemblages reflecting the ecological status of lakes in Finland, Monogr. Boreal Env. Res. 16: 43.
- Lepistö, L., Rissanen, J. and Kotilainen, P. 1998. Intensive monitoring of algal blooms in Finnish inland and coastal waters. Ympäristö ja Terveys 7/98: 30–36.
- Olrik, K., Blomqvist, P., Brettum, P., Cronberg, G. and Eloranta, P. 1998. Methods for quantitative assessment of phytoplankton in freshwaters, part I. Naturvårdsverket, Svensk miljöövervakning, Rapport 4860. 86 pp.
- Tikkanen, E. and Willén, T. 1992. Växtplanktonflora, Naturvårdsverket, Eskilstuna. 280 pp.
- Utermöhl, H. 1958. Zur vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. Mitt. Internat. Verein. Limnol. 9: 1–38.
- Willén, E. 2000. Phytoplankton in water quality assessment – An indicator concept. In: Heinonen, P., Ziglio, G. and Van der Beken (eds.) Hydrological and Limnological Aspects of Lake Monitoring: 58–80.

Стандарты

- EN 13946:2003; Water quality – Guidance standard for the routine sampling and pretreatment of benthic diatoms from rivers
- EN 14407:2003; Water quality – Guidance standard for the identification, enumeration and interpretation of benthic diatom samples from running waters
- EN 15204:2006; Water quality – Guidance standard on the enumeration of phytoplankton abundance and composition using inverted microscopy (Utermöhl technique)
- CEN/ TC 230/WG 2/TG 3/N 94; Water quality – Guidance standard for surveying, sampling and laboratory analysis of phytobenthos in fast shallow running waters

2.3

Определение хлорофилла «а» в воде

Во всех зеленых растениях содержится хлорофилл «а», который является необходимым пигментом процесса фотосинтеза. При использовании данного метода анализа все водоросли и другие частицы пробы отфильтровываются из воды. Пигмент водорослей экстрагируется из фильтра в горячий этанол, в котором активность энзимов хлорофилла уменьшается, и экстракция пигмента проходит в лучших условиях. Содержание хлорофилла «а» в экстракте измеряется с помощью спектрофотометра. Выделенный хлорофилл особенно чувствителен к воздействию света. Пробы и экстракт нельзя хранить на свету. Окончательный экстракт осветляют путем фильтрации или применяя центрифугу. Если, несмотря на это, образец остается мутным, то возникающую ошибку устраняют, выполняя измерения на двух различных длинах волн.

Концентрацию хлорофилла можно использовать как косвенный показатель оценки биомассы фитопланктона. В некоторых случаях содержание хлорофилла в воде можно считать показателем объема продукции фитопланктона.

Методика подходит для измерения количества фитопланктона и придонной растительности в естественных водоемах, а также для измерения массы водорослей в некоторых тестах. Методика не позволяет выполнять исследования других пигментов, таких как хлорофилл «b» и «c», а также и продуктов распада хлорофилла. Пигмент фототропных бактерий затрудняет определение хлорофилла «a».

Стандарты

ISO 10260: 1992; Water quality – Measurement of biochemical parameters – Spectrometric determination of the chlorophyll-concentration
HELCOM, Phytoplankton Chlorophyll-a, Manual for Marine Monitoring in the COMBINE Programme of HELCOM, Annex C-4. 5 pp.

2.4

Первичная продукция

Пертти Хейнонен, Институт окружающей среды Финляндии (pertti.heinonen@ymparisto.fi)

2.4.1

Общие сведения

Определение первичной продукции фитопланктона является одним из самых распространенных методов исследования водоемов. Первичная продукция – это количество связанного с фитопланктоном неорганического углерода, определяемое в сутках на единицу площади или на единицу объема.

Первичную продукцию можно, например, измерить непосредственно в водоеме, этот метод обозначается термином *in situ*. Так как температура воды в водоеме, условия освещения и другие природные факторы оказывают существенное влияние на первичную продукцию, то в лимнологии, кроме того, принято определять и способность к первичной продукции фитопланктона в лабораторных условиях.

На основе двух вышеуказанных определений исследуют количество нового органического вещества, образовавшегося в результате биологических процессов. Раньше первичная продукция определялась так называемым «кислородным способом», однако в настоящее время измерения выполняют с использованием радиоактивного углерода. При работе с радиоактивным раствором необходимо строго соблюдать меры предосторожности.

2.4.2

Определение первичной продукции *in situ*

Изначально определение первичной продукции всегда выполнялось непосредственно в водоеме. Принцип исследования следующий. Необходимое для исследования количество воды отбирают в две колбы, куда добавляют известное количество раствора радиоактивного углерода. Затем одну колбу полностью затемняют – это будет контрольный образец, а вторую оставляют открытой. Обе колбы помещаются обратно в воду на глубину отбора пробы воды и оставляют, как правило, на 24 часа. Затем, измеряя количество радиоактивного углерода, определяют количество углерода, который был связан в биологическом процессе в затемненной колбе.

Пробы отбирают из поверхностного слоя воды (проба с глубины одного метра или из трубчатого батометра 0–2 м) в затемненную пластмассовую емкость с крышкой (для защиты от света) и тщательно перемешивают. Сам анализ первичной продукции выполняют в 100-миллилитровых колбах из прозрачного стекла с плотными пробками. Колбы наполняют водой пробы так, чтобы там осталось немного воздуха. В обе колбы добавляют раствор радиоактивного углерода (используют готовые ампулы) и тщательно перемешивают.

Одну из двух колб заворачивают в черную непрозрачную пленку или в алюминиевую фольгу, а другая остается на свету. Колбы помещают на глубину отбора проб, причем колбы с образцами укрепляют на штативе в горизонтальном положении. Ровно через 24 часа колбы поднимают и в каждую из них добавляют 0,5 мл нейтрального формалина. Определение радиоактивного углерода выполняют в лаборатории.

На практике все указанные действия выполнить достаточно просто, однако применение метода осложняется тем, что пробы должны быть отобраны дважды. Это, естественно, увеличивает расходы на проведение исследований.

2.4.3

Способность к первичной продукции

Широкое распространение получил метод обработки проб в лаборатории из соображений сокращения расходов на проведение исследований. Способность к первичной продукции замеряется в стандартных, постоянных условиях (температура и освещение), значительно отличающихся от тех, при которых происходил отбор проб. Применяя данный метод, необходимо учитывать и проблемы, возникающие в связи с транспортировкой проб.

Инструкции, приведенные ниже, описывают метод определения первичной продукции, используемый при изучении морской воды (метод P/I) в условиях лаборатории научно-исследовательского судна. Рекомендованный ICES – Международным Советом морских исследований – стандартный инкубатор применяется во всех исследованиях по определению первичной продукции, например, в программе мониторинга Балтийского моря. С помощью данного метода определяется скорость поглощения углерода, что в свою очередь позволяет измерить параметры фотосинтеза и количества света. Проба инкубируется сразу же после ее отбора.

Пробы инкубируют в колбах со специальным покрытием, в которых параметры процесса фотосинтеза измеряют при разной интенсивности излучения. Измерение проводится в 12 колбах, включая затемненные. В пробы добавляют раствор ^{14}C . Время инкубации составляет 120 минут, при этом колбы в инкубаторе вращаются со скоростью 10 оборотов в минуту. Температура должна быть равной температуре *in situ*. Определение необходимо выполнить как минимум 15 раз за вегетативный период в условиях открытого моря. В прибрежной зоне частота отбора проб должна быть еще чаще (20–25 раз в год).

Очень часто определение способности к первичной продукции выполняется в лабораториях, значительно удаленных от места отбора проб. Время посева в лабораторных условиях (в теплом и освещенном месте) – 24 часа, после чего пробы обрабатываются как при определении *in situ*. Условия инкубирования сведены к единому стандарту, однако длительная транспортировка пробы воды часто приводит к появлению погрешности в результатах измерений.

На основании данных исследований можно вычислить количество нового органического вещества, образовавшегося при воздействии света в условиях наличия оксида углерода и питательных веществ. Указанный параметр характеризует пригодность питательных веществ в процессе экофизиологической реакции и позволяет выявить временные тренды в изменениях первичной продукции. Первичная продукция является важным связующим звеном между процессами эвтрофикации, седиментации и формированием кислородного режима в глубинных слоях. Данный метод позволяет оценить суточный объем первичной продукции и тенденцию ее развития в течение года.

Литература

Vollenweider, R. A. (ed.) 1974. *A Manual on Methods for Measuring Primary Productivity in Aquatic Environments*. IBP Handbook 12. Blackwell, Oxford. 225 pp. (2nd Edition)

Стандарты

HELCOM, *Phytoplankton Primary Production, Manual for Marine Monitoring in the COMBINE Programme of HELCOM*, Annex C-5.

2.5

Зоопланктон

Йоуко Сарвала, Университет Турку (jousar@utu.fi)

2.5.1

Общие сведения

Зоопланктон является важным звеном в пищевых цепях водоема благодаря которому продукция фитопланктона и бактериопланктона становится пищей для рыб. Количество зоопланктона растет с увеличением содержания питательных веществ, но уменьшается с увеличением числа хищников (рыб и беспозвоночных). Масса, видовой состав и распределение зоопланктона по размерам отражают уровень трофности водоема, а также и численность видов рыб, питающихся

планктоном. Видовой состав планктона может изменяться под влиянием стрессовых факторов, таких как, например, изменение показателя кислотности воды.

Сообщество зоопланктона составляют виды одноклеточных организмов, коловратки, ракообразные (Cladocera, Copepoda). В пробах зоопланктона можно обнаружить некоторые виды крупных беспозвоночных, не относящихся к планктону из-за их размера и способности к плаванию (например, рачок мизиды *Mysis* и личинки перистого комара *Chaoborus*).

2.5.2

Отбор проб

Содержание зоопланктона в воде крайне неоднородно, места его скопления быстро меняются в зависимости от времени суток и направления течения. Многие виды зоопланктона регулярно перемещаются в воде по вертикали, как правило, в определенное время суток. При изучении обширных водных пространств незначительная неоднородность в распределении зоопланктона может быть сглажена путем отбора большого количества проб. Затем в лаборатории пробы объединяют в единую суммарную или интегральную пробу. Однако с точки зрения изучения экологии зоопланктона объединение единичных проб можно считать правомерным лишь до определенной степени.

Из одной точки проба берется по всему столбу воды, например, с помощью 1-метрового батометра типа «Лимнос», последовательно, начиная с поверхности. Отбирая пробу с придонного горизонта, необходимо внимательно следить за тем, чтобы в батометр не попали донные отложения. Если это все-таки произошло, то пробу необходимо аннулировать. Пробы из стратифицированных водоемов объединяются в соответствии с расслоением по температуре, отдельно образуя пробы поверхностных и придонных слоев воды. Там, где вода перемешивается до самого дна, пробы, взятые на разной глубине, можно смешать в одну суммарную пробу.

Количество станций для отбора проб воды зависит от размера водоема. В небольших водоемах вполне достаточно сделать три отбора. Для получения достоверной картины в крупных водоемах необходимо выполнить отбор на десяти станциях. Если график исследований позволяет, то на станции целесообразно выполнить отбор параллельных интегральных проб воды. Из практических соображений отбор проб зоопланктона, как правило, производится днем. Виды, плавающие по вертикали, находятся в это время суток на глубине и это необходимо учитывать при обработке результатов.

Большое значение имеют изменения параметров зоопланктона в зависимости от времени года. В течение года различные виды занимают доминирующее положение в различные сроки. Пик численности отдельных видов может быть очень высоким, но его продолжительность составляет всего 1–2 недели. Именно поэтому сведения, полученные в результате только одного отбора проб, не являются полностью достоверными. Частота отбора проб зависит и от цели исследования. При выяснении динамики роста популяции некоторых видов ракообразных в период теплой воды промежуток между отборами проб не должен превышать одной недели, в то время как при изучении коловраток промежуток должен составлять 1–2 дня. Биомасса всего зоопланктона может быть измерена на удовлетворительном уровне с использованием проб, отобранных с промежутком в две недели в течение периода открытой воды. При изучении

предпосылок к биоманипуляциям достаточно серии из 5–6 отборов с промежутком в 2–3 недели, начиная с середины июля до середины сентября.

Простейшие (Protozoa)

Зоопланктон простейших – это паразитирующие, микроскопически мелкие одноклеточные планктонные организмы. У них чаще всего отсутствуют хлоропласты (у некоторых видов, особенно у рясничных, все-таки есть соединительные хлоропласты, обнаруживаемые в симбиотической связи, либо в процессе питания организмов). Простейшие являются одноклеточными, иногда они могут образовывать колонии. Количество одноклеточных планктонных животных можно определить только в нефилтрованной пробе под микроскопом, таким же образом, как и фитопланктон. Небольшого объема воды (0,2–1 л) обычно бывает достаточно, поэтому можно использовать небольшие батометры (например, типа «Лимнос»). Некоторых простейших можно определить прямо из пробы фитопланктона, зафиксированной раствором Люголя, однако полную картину видового разнообразия можно получить только при изучении живого материала или, используя материал, зафиксированный специальным методом.

Коловратки (Rotifera)

Коловратки – мелкие многоклеточные планктонные организмы, хотя среди них попадаются и достаточно крупные экземпляры. Число коловраток в воде бывает настолько большим, что для оценки их количества достаточно 0,2–2 литров пробы воды. Часть коловраток проходит сквозь сеть с ячейкой 50 μm , традиционно применяемую для отбора ракообразных во внутренних водах. Для получения более точных сведений пробы воды для выявления коловраток следовало бы пропускать сквозь планктонную сеть с размером ячеек 25 μm или выполнить процедуру осаждения / выпадения в осадок всех организмов из зафиксированной пробы. Отметим, что метод осаждения до сих пор применяется редко. Самым простым методом является отбор части воды для определения коловраток из пробы, предназначенной для анализа ракообразных перед тем, как последняя будет отфильтрована. Для фиксации подходят те же вещества. Для выявления некоторых видов следует исследовать и живой материал.

В некоторых водоемах видовой состав коловраток можно изучать после инкубации в лаборатории яиц коловраток, полученных из донных отложений водоема.

Ракообразные (Crustacea: Cladocera, Copepoda: Calanoida и Cyclopoida)

Наиболее значительную и изученную группу зоопланктона представляют собой ракообразные (водяные блохи, циклопы, ветвистоусые и ветвистоногие). При изучении ракообразных необходимо отбирать большие объемы воды для того, чтобы в рамках исследований крупные, но немногочисленные виды были бы определены и изучены. В бедных питательными веществами водоемах можно порекомендовать для отбора около 100 литров воды, а в богатых – ограничиться десятью литрами.

Крупные ракообразные в определенной степени способны уклоняться от пробоотборника, который обычно вызывает колебания воды. Наиболее репрезентативные пробы можно получить, используя прозрачный трубчатый батометр большого объема (более 20 литров).

Батометр опускают в воду раскрытым и быстро закрывают на глубине отбора пробы. Применение большого батометра требует использования лебедки, поэтому при отборе проб с небольшой лодки применяют схожие по конструкции, но менее крупные, примерно 7-литровые батометры. В эвтрофированных водоемах, где мутная вода снижает активность планктона, можно использовать батометр типа «Лимнос» размером 50 см (объем 3,5 литра). В этом случае необходимо последовательно поднять две пробы с каждого метра глубины.

Поднятые с помощью батометра пробы фильтруются прямо в лодке через планктонную сеть с размером ячеек 50 мкм. При использовании сети 25 мкм можно параллельно получить и репрезентативную пробу коловраток. Отметим, что в эвтрофированных водоемах это не представляется возможным, так как сеть с таким маленьким размером ячеек слишком быстро забивается. Рекомендуемые к использованию планктонные сети на открытых пространствах Балтийского моря могут быть использованы и в глубоководных озерах. Однако эффективность отбора проб планктонной сетью значительно ниже, чем батометром.

Все пробы с одной станции фиксируются на берегу и разливаются по отдельным бутылкам. Пробы, поднятые из каждого слоя воды, фильтруют через планктонную сеть. Это можно сделать с помощью пластикового ведра, куда сливают все пробы, поднятые из одного слоя воды. Затем отбирают пробу небольшого объема для определения простейших и коловраток. Оставшийся объем воды, величина которого точно известна, выливают в сеть. Ведро тщательно ополаскивают. Использование ведра облегчает работу и предотвращает повреждение материала сети при работе в трудных полевых условиях. Когда все пробы из одного слоя воды отобраны, осевший в нижней части сети планктон выливают в пластиковую емкость 250 мл. После этого краник сети плотно закрывают. Сеть опускают целиком в воду и немедленно поднимают, а планктон, оказавшийся в нижней части сети, вновь отбирают в бутылку. Полоскание сети повторяют еще два раза.

После этого в бутылку наливается консервирующее вещество. Раньше в качестве фиксатора применялся концентрированный формальдегид (38%), он составлял 1/9 часть или 4% от объема пробы. Холодный раствор формальдегида с сахаром хорошо консервирует яйца и зародыши водяных блох в их оболочке. Для краткосрочного консервирования подходит раствор Люголя. В настоящее время для фиксации планктона ракообразных рекомендуется использовать 94-процентный этанол, содержание которого в пробе доводится до 70%. И в этом случае применение охлажденного до 5 °С консервирующего вещества хорошо сохраняет яйца и эмбрионы водяных блох. На колбах с образцами необходимо аккуратно записать место, дату, время суток, тип пробоотборника, его объем, глубину отбора пробы и количество подъемов, общий объем пробы воды.

2.5.3

Обработка проб в лаборатории

В лаборатории до работы с микроскопом суммарные по каждой вертикали пробы объединяют в интегральные пробы по региону. Для сокращения числа колб с образцами это можно выполнить сразу же после отбора проб (посуду тщательно ополаскивают для предупреждения загрязнения / контаминации). Объединяемые пробы сливают одна за другой в мелкую лабораторную сеть

(25 µm), содержание которой смывается для дальнейшего хранения с помощью бутылки, оборудованной разбрызгивателем, в пластиковую бутылку объемом 100 или 250 мл (в качестве вещества-ополаскивателя можно применять 70-процентный этанол).

Определение, подсчет и измерение организмов производятся с помощью оптического / светового микроскопа. Перед анализом проба выливается в лабораторную сеть, консервант вымывается водой, и вместе с водой организмы помещаются в делительную кювету или сразу в кювету с водой микроскопа. Жидкости дают отстояться, чтобы организмы осели на дно кюветы. Зафиксированные с помощью этанола организмы оседают в воде достаточно быстро. Для того чтобы осаждение прошло успешно, в воду можно добавить одну каплю моющего средства. Очень удобно использовать две кюветы, тогда пока в одной идет осаждение, содержание второй можно исследовать. При обработке необходимо осматривать все дно кюветы полностью, так как распределение организмов в ней неоднородно. Для того чтобы в кювете было достаточное количество организмов, пробу необходимо переливать в кювету по частям. После подсчета проба вновь переливается в колбу для хранения с 70-процентным этанолом.

В пробах зоопланктона количество организмов обычно так велико, что обработать ее полностью не представляется возможным. Поэтому пробы необходимо разделить на части (методы деления хорошо описаны в литературе). Правильное деление имеет большое значение и с точки зрения трудоемкости, и с точки зрения точности исследования. Так же, как и при отборе проб в водоеме, успех правильного деления пробы зависит от размера и количества частей и организмов. При исследованиях под микроскопом точность измерений значительно снижается, если количество подсчитанных организмов меньше двадцати. С другой стороны, точность не улучшается, если число подсчитанных организмов в пробе превышает 200. Для всех видов никогда не удастся добиться нужного числа отдельных организмов для обеспечения совершенной точности оценки их численности. Для достижения оптимального соотношения точности и трудозатрат по доминирующим видам исследуют 100–200 экземпляров (определяемых единиц) (при работе с личинками ветвистоусых ракообразных необходимо исследовать 50 особей каждого вида или группы; при обработке остальных личинок этой части пробы каждый вид подсчитывается с точностью до определяемых экземпляров). Если в пробе мало организмов, то их подсчитывают полностью. Умение отбирать нужное количество воды для исследований приходит с практикой. Для начала рекомендуется отбирать небольшие порции пробы и изучать в них все организмы.

После того как самые многочисленные виды будут подсчитаны, из следующих частей пробы подсчитывают малочисленные виды и, при необходимости, крупные экземпляры; наиболее редкие виды учитываются из всей пробы. Такой ступенчатый метод обработки под микроскопом позволяет получить достоверную картину видового состава зоопланктона. Количество выявленных видов чаще всего почти линейно зависит от логарифма количества исследованных экземпляров. Полное определение видового состава предполагает изучение пробы большего объема, чем в случае просто оценки обилия / численности вида. Виды разного размера можно отделить друг от друга с помощью различных лабораторных сит, однако на практике это сделать довольно трудно.

В недавнем прошлом биомасса зоопланктона представлялась как свежая масса, рассчитанная исходя из его объема. Соотношение занесенных в специальные таблицы единиц объема и

реальной биомассы, так же, как и содержание воды в свежей массе, существенно изменяется в зависимости от вида организмов. Наиболее точное значение биомассы можно получить, используя сведения о сухой массе органического вещества или по массе углерода.

Рекомендуется сообщать биомассу зоопланктона в виде органического углерода, который можно относительно легко и точно определить и в микроскопически мелких объектах. Используя единицы углерода, зоопланктон связывается с деятельностью всей водной экосистемы, например, с энергетическими потоками или с обменом веществ. Данные о биомассе получают, определив видовой состав, этапы развития видов и далее путем перевода полученного числа особей в биомассу с помощью специальных таблиц сухой массы или углерода. Таблицы составлены для отдельных видов зоопланктона и отдельных этапов развития видов. Чем ближе удастся приблизиться к указанному числу особей, тем точнее будут полученные значения биомассы. Наиболее достоверные цифры по биомассе можно получить, измеряя размеры каждого вида по определенным методикам и применяя для изучения биомассы соответствующие видам формулы связи углерода и размеров или сухой массы и размеров организмов.

Опыт показывает, что различие указанных формул связей между количеством углерода и размерами отдельных видов для различных водоемов оказывается довольно незначительным. Для определения содержания углерода в конкретном озере можно законсервировать пробы, заморозив их в некрепком растворе формальдегида. Погрешность, вызванная расчетом на основе связи между массой и линейными размерами, бывает значительно меньше, чем при определении с использованием только численных показателей.

Полученные разными способами значения биомассы можно сравнивать между собой, используя переводные коэффициенты. В соответствии с наиболее часто используемыми коэффициентами содержание органического углерода в свежей массе равно 6%, в сухой массе 45% и в органической сухой массе 50%. Содержание углерода в свежей массе коловратки *Asplanchna* значительно ниже и изменяется по сравнению с другими видами значительно больше.

Обработка видов по размеру является очень трудоемкой, однако, показатель, связанный с распределением численности водных блох / ветвистоусых по группам в зависимости от размеров является надежным / чувствительным показателем при определении численности рыб, питающихся планктоном. Показатель можно использовать и при оценке последствий возможных биоманипуляций во время работ, связанных с восстановлением водоема.

Литература

- Alden, R. W. III, Dahiya, R. C. and Young, R. J. Jr. 1982. A method for the enumeration of zooplankton subsamples. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 59: 185–206.
- Bottrell, H. H., Duncan, A., Gliwicz, Z. M., Grygierek, E., Herzig, A., Hillbricht-Ilkowska, A., Kurasawa, H., Larsson, P. and Weglenska, T. 1976. A review of some problems in zooplankton production studies. *Norw. J. Zool.* 24: 419–456.
- Downing, J. A. and Rigler, F. H. (eds.) 1984. A manual on methods for the assessment of secondary production in fresh waters. Blackwell Scientific Publications.
- Downing, J., Perusse, M. and Frenette, Y. 1987. Effect of interreplicate variance on zooplankton sampling design and data analysis. *Limnol. Oceanogr.* 32: 673–680.
- Dybern, B. I., Ackefors, H. and Elmgren, R. 1976. Recommendations on methods for marine biological studies in the Baltic Sea. The Baltic Marine Biologists Publication 1. 98 pp.

- Evans, M. S. and Sell, D. W. 1983. Zooplankton sampling strategies for environmental studies. *Hydrobiologia* 99: 215–223.
- Frolander, H. F. 1968. Statistical variation in zooplankton numbers from subsampling with a Stempel pipette. *J. Water Pollut. Control Fed.* 40: R82–R88.
- Griffiths, F. B., Brown, G. H., Reid, D. D. and Parker, R. R. 1984. Estimation of sample zooplankton abundance from Folsom splitter sub-samples. *J. Plankton Res.* 6: 721–731.
- Hakkari, L. 1978. On the productivity and ecology of zooplankton and its role as food for fish in some lakes in Central Finland. *Biol. Res. Rep. Univ. Jyväskylä* 4: 3–87.
- HELCOM 1988. Baltic Marine Environment Protection Commission – Helsinki Commission – 1988. Guidelines for the Baltic Monitoring Programme for the third stage; Part D. Biological determinands. *Baltic Sea Environment Proceedings* 27D. Helsinki.
- Hernroth, L. and Viljamaa, H. 1979. Recommendations on methods for marine biological studies in the Baltic Sea. Mesozooplankton biomass assessment. The Baltic Marine Biologists Publication 6. 15 pp.
- Heyman, U., Ekbohm, G., Blomqvist, P. and Grundström, R. 1982. The precision of abundance estimates of plankton from composite samples. *Water Res.* 16: 1367–1370.
- Kankaala, P. 1984. A quantitative comparison of two zooplankton sampling methods, a plankton trap and a towed net, in the Baltic. *Int. Rev. ges. Hydrobiol.* 69: 277–287.
- Kankaala, P. and Johansson, S. 1986. The influence of individual variation on length-biomass regressions in three crustacean zooplankton species. *J. Plankton Res.* 8: 1027–1038.
- Karjalainen, J., Rahkola, M., Viljanen, M., Andronikova, I. and Avinskii, V. A. 1996. Comparison of methods used in zooplankton sampling and counting in the joint Russian-Finnish evaluation of the trophic state of Lake Ladoga. *Hydrobiologia* 322: 249–253.
- Keskitalo, J. and Salonen, K. 1994. Manual for integrated monitoring. Subprogramme Hydrobiology of lakes. *Vesi- ja ympäristöhallinnon julkaisuja B* 16. 40 pp.
- Latja, R. and Salonen, K. 1978. Carbon analysis for the determination of individual biomasses of planktonic animals. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 20: 2556–2560.
- May, L. 1986. Rotifer sampling – a complete species list from one visit? *Hydrobiologia* 134: 117–120.
- Prepas, E. 1978. Sugar-frosted *Daphnia*: an improved fixation technique for Cladocera. *Limnol. Oceanogr.* 557–559.
- Rahkola, M., Karjalainen, J. and Viljanen, M. 1994. Evaluation of a pumping system for sampling zooplankton. *J. Plankton Res.* 16: 905–910.
- Rahkola, M., Karjalainen, J. and Avinsky, V. A. 1998. Individual weight estimates of zooplankton based on length-weight regressions in Lake Ladoga and Saimaa lake system. *Nordic J. Freshw. Res.* 74: 110–120.
- Salonen, K. 1981. Determination of carbon - an alternative method for the estimation of biomass of zooplankton. *Lammi Notes* 5: 7–11.
- Salonen, K. and Latja, R. 1988. Variation in the carbon content of two *Asplanchna* species. *Hydrobiologia* 162: 79–87.
- Salonen, K. and Sarvala, J. 1985. Combination of freezing and aldehyde fixation – a superior preservation method for biomass determination of aquatic invertebrates. *Arch. Hydrobiol.* 103: 217–230.
- Salonen, K., Sarvala, J., Hakala, I. and Viljanen, M.-L. 1976. The relation of energy and organic carbon in aquatic invertebrates. *Limnology and Oceanography* 21: 724–730.
- Sarvala, J. 1999. Biological monitoring – significance of monitoring and time series. *Univ. Joensuu, Publ. Karelian Inst.* 126: 117–128.
- Sarvala, J. and Halsinaho, S. 1990. Crustacean zooplankton of Finnish forest lakes in relation to acidity and other environmental factors. In: Kauppi, P., Anttila, P. and Kenttämies, K. (eds.) *Acidification in Finland: 1009–1027*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Sarvala, J. ja Perttula, H. 1994. Littoistenjärvi. Littoistenjärviyöryhmä, Kaarinan kaupunki, Liedon kunta. Kaarina 1994. 78 s.
- Sarvala, J., Helminen, H., Saarikari, V., Salonen, S. and Vuorio, K. 1998. Relations between planktivorous fish abundance, zooplankton and phytoplankton in three lakes of differing productivity. *Hydrobiologia* 363: 81–95.
- Sarvala, J., Kankaala, P., Zingel, P. and Arvola, L. 1999. Chapter 6.2. Zooplankton. In: Keskitalo, J. and Eloranta, P. (eds.) *Limnology of humic waters: 173–191*. Backhuys Publishers, Leiden.
- Schindler, D. W. 1969. Two useful devices for vertical plankton and water sampling. *J. Fish. Res. Board Can.* 26: 1948–1955.

- Telesh, I. V., Rahkola, M. and Viljanen, M. 1998. Carbon content of some freshwater rotifers. *Hydrobiologia* 387/388: 355–360.
- Van Guelpen, L., Markle, D. F. and Duggan, D. J. 1982. An evaluation of accuracy, precision, and speed of several zooplankton subsampling techniques. *J. Cons. Int. Explor. Mer* 40: 226–236.
- Vasama, A. and Kankaala, P. 1990. Carbon-length regressions of planktonic Crustaceans in Lake Ala-Kitka (NE-Finland). *Aqua Fennica* 20: 95–102.

Стандарты

EN 15110:2006; Water quality – Guidance standard for the routine sampling of zooplankton from standing waters

2.6

Перифитон

2.6.1

Общие сведения

Перифитоном называют прикрепившиеся к какой-либо поверхности или растущие на какой-либо поверхности водоросли и другие мелкие организмы. Живые организмы перифитона очень чутко реагируют на изменения окружающей среды. Многие из них не способны получать питательные вещества из поверхности / субстрата, к которому прикреплены, поэтому их развитие полностью зависит от качества среды обитания. Растительность перифитона четко отражает эвтрофикацию водоема, поэтому этот биологический объект часто используют при изучении загрязненности воды.

Перифитон можно исследовать как в естественной среде, так и на искусственных поверхностях / субстратах. Получение количественных проб с неровных природных поверхностей является затруднительным, поэтому в настоящее время чаще используются искусственные поверхности. Плюсом наиболее часто применяемой стеклянной поверхности является то, что прикрепленный к ней перифитон можно изучать под микроскопом «в живом виде». Иными материалами для изготовления субстратов являются пластик, дерево, глина, асбест, бетон, металлы и плоские камни. В дополнение к возможности получения проб для определения качественных показателей искусственные субстраты обладают рядом преимуществ:

- на них нет иной растительности;
- они являются однородными по размеру, структуре и составу;
- упрощается разработка единых методов отбора проб;
- с ними удобно обращаться;
- легко транспортировать в лабораторию;
- легко установить точный возраст живого сообщества;
- легко организовать исследования и выполнить сравнения перифитона в разных водоемах.

Определение перифитона дает дополнительную информацию при изучении загрязненности проточных водоемов, причем особое внимание уделяется диатомовым. Ранее показателем загрязненности считалось наличие определенных видов-индикаторов или сообществ организмов. В настоящее время проверка делается на основе всего сообщества живых организмов. В быстротекущих водах перифитон может быть единственным продуцентом первичной продукции. В озерах и ламбушках перифитон может иметь значение наряду с фитопланктоном.

Скорость течения, освещенность места отбора пробы, температура воды, глубина и состав дна влияют на образование перифитона в проточной воде. Указанные факторы необходимо учитывать при выборе места отбора пробы. Всегда следует измерять скорость течения. В озерах и иных водоемах со слабым течением нужно учитывать степень защищенности берега, водную растительность, положение относительно сторон света, общую глубину водоема, а также возможные течения. Исследования, выполненные при разных скоростях течения, нельзя сравнивать между собой.

2.6.2

Определение перифитона в естественных условиях

Пертти Элоранта, университет Хельсинки (pertti.eloranta@helsinki.fi)

2.6.2.1

Методы

Водоросли можно разделить на два вида: прикрепленные к поверхности (перифитон) и отдельные от нее. Основное количество перифитона встречается на камнях (эпилитон) и на растениях (эпифитон), в меньшей степени – на других поверхностях, например: днищах лодок, затопленных конструкциях, древесине. Организмы, прикрепившиеся к донным отложениям (эпипелон) и песку (эпипсаммон), относятся к бентосным сообществам, но не к перифитону.

Изучение водорослей играет важную роль в мониторинге и оценке состояния проточных водных систем. В небольших реках и ручьях только перифитон образует сообщество продуцентов первичной продукции, так как фитопланктон там отсутствует, а крупные водные растения зависят от наличия дна с особыми свойствами. Крупные растения встречаются только в определенных местах, а предоставляемая ими информация бывает более ограниченной, чем полученная при изучении водорослей.

2.6.2.2

Принцип

Метод основан на выявлении и определении соотношений популяций таксонов-индикаторов, встречающихся в сообществах водорослей, указывающих на характер или изменения различных факторов (количество питательных веществ, органического вещества, сапробность, рН и т. д.). В принципе, можно использовать представителей всех групп водорослей, однако определение крупных видов, особенно крупных ленточных водорослей, на практике невозможно. Они встречаются лишь местами, и, кроме того, индикативная способность некоторых видов еще мало изучена. Поэтому исследователи часто опираются на анализ сообщества диатомовых. Каждый

вид водорослей развивается только в наиболее благоприятных для него условиях. Чем больше благоприятных факторов представлено, тем больше численность вида и тем более значительную часть занимает он во всем сообществе. Структура сообщества формируется также в соответствии с тем, какие субстраты существуют в месте наблюдений. Отметим, что в водных экосистемах встречается так много видов, в том числе и видов-индикаторов, что метод подходит и для мягкого, и для твердого дна.

2.6.2.3

Область применения метода

Метод особенно подходит для изучения проточных водоемов. С его помощью можно определить влияние точечных загрязнителей и изменения масштабов влияния нагрузок в нижних створах. В реках можно быстро получить общую картину состояния основного русла, а также и отдельных притоков, определить факторы, негативно или позитивно влияющие на состояние реки. Определяя параметры видов-индикаторов, оценивается общее состояние различных участков реки. Можно составить цветные карты точно так же, как это делают, представляя результаты обычной классификации вод. Данный метод дополняет результаты физико-химических исследований. Поскольку изменения в видовом составе водорослей происходят не так быстро, как в случае физико-химических параметров, они с достаточной точностью отражают изменения, происходящие в водоеме. В непроточных водоемах данный метод подходит для изучения изменений, связанных с антропогенным воздействием объектов, расположенных на ближайших к водоему участках водосбора.

2.6.2.4

Макроскопические водоросли

Изучение перифитона может идти в двух направлениях: микроскопические и макроскопические водоросли. Макроскопические водоросли в качестве объекта мониторинга изучены хуже, так как встречаются лишь эпизодически / временами и лишь в некоторых районах водоемов. К тому же большая часть водорослей (обычные ленточные и псевдопаренхиматические) стерильна, так что определения можно выполнить лишь на уровне рода, даже если у исследователя есть большой опыт определения видов. Экологические требования к макроскопическим водорослям изучены хуже, чем к диатомовым, поэтому получаемая информация скудна и менее надежна.

Несмотря на то, что макроскопические водоросли (ленточные прокариоты / синезеленые, зеленые, желтые, золотистые (*Nudifurcus*), соединенные или красные водоросли) довольно часто встречаются в проточной воде, все же есть смысл записывать информацию о них для проведения сравнительного анализа видового разнообразия и получения дополнительной информации в будущем. Отдельные роды макроскопических водорослей являются индикаторами для некоторых факторов, определяющих качество воды и состояние водоема. Информация, полученная о макроскопических водорослях, остается пока в Финляндии скудной. В то же время, в сравнении с другими странами Европы в пресных проточных водоемах Финляндии очень разнообразна флора красных водорослей. Во многих странах Центральной Европы эта группа водорослей находится под угрозой исчезновения, в Финляндии также ощущается острая нехватка сведений об этих водорослях.

Пробы макроскопических водорослей можно отбирать широкой пипеткой. Если речь идет о водорослях, прочно прикрепившихся к камням, как, например, относящаяся к красным водорослям *Lemanea*, то пробы нужно снимать с камня пинцетом. Образцы консервируют в формалине (2–4%). Сразу после взятия пробы необходимо зафиксировать первоначальный цвет, так как в формалине он меняется очень быстро. При работе в полевых условиях целесообразно использовать небольшой водный бинокль, потому что движение и бликование воды очень затрудняют видимость. К водному биноклю можно прикрепить маленький галогеновый фонарик, так как в лесных ручейках с темной водой и плохим освещением видимость может быть очень низкой.

На основании анализа прибрежных водорослей можно получить некоторые сведения общего характера, но из-за эпизодичности проявления, литоральной (прибрежной) смешанности (гетерогенности) и относительно маленького количества видов, ленточные водоросли не учитываются при мониторинге берегов озер. Вместе с тем, наблюдая за ленточными водорослями, можно отслеживать изменения, происходящие в больших источниках и источниковых ламбинах.

2.6.2.5

Микроскопические водоросли

Хотя в перифитоне есть множество групп микроскопических водорослей, с точки зрения изучения и мониторинга водоемов наибольшее значение имеют диатомеи / диатомовые / кремнистые.

Пробы перифитона, произрастающие в естественных условиях, необходимо снимать с твердых поверхностей, например, с камней. В месте отбора пробы выбирают несколько камней и очищают с помощью зубной щетки. Если в точке наблюдений нет камней, которые можно вынуть из воды, то пробу необходимо собрать с камня, обрабатывая его как «пылесосом» особым прибором. Область отбора пробы изолируется от окружающего потока воды, водоросли отделяются с помощью крутящейся щетки и помещают в колбу. Однако подобные приспособления используются редко, поэтому следует оценить возможность получения пробы и с других поверхностей. Для случая длительных исследований на четко обозначенном участке водоема можно разместить подходящие камни, на которых в течение нескольких месяцев образуется равномерное сообщество водорослей. В последующие годы пробы можно будет брать с этих же камней.

В водоемах со спокойным течением встречаются крупные водные растения, на поверхностях которых находит себе пристанище эпифитичный перифитон. Время роста некоторых частей больших водяных растений различно, соответственно и видовой состав водорослей, растущих на их поверхностях, значительно беднее, чем на камнях, поэтому образцы нужно обязательно снимать с разных растений и их частей. Как и с камней, с растений пробу переносят щеткой на пластмассовое блюдо, и далее консервируют, как уже было описано выше.

В водах с медленным течением и там, где нет подходящих жестких, твердых поверхностей, пробы отбирают с донных отложений, медленно проводя пипеткой по их поверхности. Необходимо помнить, что пробы следует отбирать с освещенной части дна на глубине 20 см, но не более 0,5 м. Виды, находящиеся на поверхности донных отложений водоема, не являются перифитоном, однако их видовой состав очень разнообразен. Результаты анализа дают много

полезной информации, объем которой сравним с результатами исследований сообществ на твердых поверхностях. Отметим, однако, что сообщество, растущее на поверхности донных отложений, подвержено влиянию наносов, связанных с изменениями течения, а также и процессу осадкообразования. Источник осадочного материала находится выше по течению, возможно, в иных физических и химических условиях, так что данное сообщество не точно отражает локальные условия, в сравнении с пробой, взятой с поверхности камня.

Весь собранный материал пробы консервируют. В качестве консерванта можно использовать формалин или спирт. Качество консерванта не так важно, так как при приготовлении препаратов путем «мокрого сжигания» из них полностью удаляются органические вещества. Отбор количественных проб с естественных поверхностей нежелателен, так как четко определить место отбора очень сложно, и в масштабах одного камня плотность проявления материала очень неравномерна, она зависит от условий освещения и направления течения. Слой водного мха также может повлиять на результат анализа. Необходимо заметить, что в отличие от оценки биомассы фитопланктона расчеты плотности клеток и/или вычисления биомассы не дают достаточных оснований, к примеру, для определения уровня трофности водоема. Результаты анализа описывают структуру видового состава, его многообразие и распределение / соотношении видов. Качество и свойства воды можно охарактеризовать с помощью соотношения различных групп- индикаторов и различных индексов качества воды. Индексы качества характеризуют чаще всего сапробию, нагрузку по органическим веществам или избыток питательных веществ. С помощью уравнений, используемых в палеолимонологических исследованиях, можно, например, вычислить pH воды.

Литература

- Dell'Uomo, A. 1991. Use of benthic macroalgae for monitoring rivers in Italy. In: Whitton, B. A., Rott, E., Friedrich, G. (eds.) Use of algae for monitoring rivers. Institut für Botanik, Universität Innsbruck, Innsbruck. 129–137.
- Eloranta, P. and Kwandrans, J. 1996. Distribution and ecology of freshwater red algae (Rhodophyta) in some central Finnish rivers. *Nordic J. Botany* 16: 107–117.
- Eloranta, P. 1991. Use of algae for monitoring rivers in Finland. In: Whitton, B. A., Rott, E., Friedrich, G. (eds.) Use of algae for monitoring rivers. Institut für Botanik, Universität Innsbruck, Innsbruck. 71–74.
- Eloranta, P. 1995. Type and quality of river waters in central Finland described using diatom indices. In: Marino, D. and Montresor, M. (eds.) 13th Internat. Diatom Symposium 1994, Acquafredda di Maratea, Italy. 271–280.
- Eloranta, P. 1999. Applications of diatom indices in Finnish waters. In: Prygiel, J., Whitton, B. A. and Bukowska, J. (eds.) Use of algae for monitoring rivers III. 138–144.
- Eloranta, P. and Anderson, K. 1996. Diatom indices in water quality monitoring of some South-Finnish rivers. *Proceed. Internat. Assoc. Limnol.* 26: 1213–1215.
- Eloranta, P. and Kwandrans, J. 1999b. Quality of River Vantaanjoki (South Finland) described using diatom indices. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 27.
- Kwandrans, J. and Eloranta, P. 1994. *Tuomeya americana* a freshwater red alga new to Europe. *Algological Studies* 74: 27–33.
- Kwandrans, J., Eloranta, P., Kawecka, B. and Wojtan, K. 1998. Use of benthic diatom communities to evaluate water quality in rivers of southern Poland. *J. appl. Phycol.* 10: 193–201.
- Lindström, E. A. 1991. Use of periphyton for monitoring rivers in Norway. Application of previously obtained data to evaluate impacts of acid precipitation. In: Whitton, B. A., Rott, E. and Friedrich, G. (eds.) Use of algae for monitoring rivers. Institut für Botanik, Universität Innsbruck, Innsbruck. 139–144.

- Lindström, E. A. 1992. Tålegrenser for overflatevann. Fastsittande alger. Norsk institutt for vannforskning (NIVA). Fagrapport 27. 49 s. Oslo.
- Lindström, E. A. 1999. Attempts to assess biodiversity of epilithic algae in running water in Norway. In: Prygiel, J., Whitton, B. A. and Bukowska, J. (eds.) Use of algae for monitoring rivers III. 253–260.
- Prygiel, J. and Coste, M. 1999. Progress in the use of diatom for monitoring rivers in France. In: Prygiel, J., Whitton, B. A. and Bukowska, J. (eds.) Use of algae for monitoring rivers III. 165–179.
- Whitton, B. A., Rott, E. and Friedrich, G. (eds.) 1991. Use of algae for monitoring rivers. Institut für Botanik, Universität Innsbruck, Innsbruck. 193 pp.

2.6.3

Диатомовые водоросли

Пертти Элоранта, университет Хельсинки (pertti.eloranta@helsinki.fi)

2.6.3.1

Общие сведения

Диатомовые водоросли традиционно используются в палеолимонологических исследованиях. Во всем мире благодаря повсеместному применению диатомовые водоросли уже хорошо изучены именно с точки зрения многообразия видов, исследованы их экологические особенности и условия обитания. На основе полученных знаний разработано несколько методов исследования качества воды.

При изучении проточных водоемов анализ диатомовых имеет ряд преимуществ:

- они могут быть обнаружены в любое время года;
- они встречаются в различных водоемах независимо от качества дна и скорости течения;
- плотность их клеток весьма значительна;
- общее число таксонов в пресной воде достигает 5000–6000 (в базе данных уже зафиксировано около 9000 наименований, но картотека включает в себя множество синонимов);
- разнообразие диатомовых часто бывает довольно высоким, так что картина видового состава и связей между видами получается вполне удовлетворительной, в отличие от выводов, сделанных на основании обработки небольшого пробного материала, что в свою очередь ускоряет этап работы в поле (для сравнения: беспозвоночные или крупные водные растения);
- экология видов хорошо изучена, поэтому в дополнение к знаниям о разнообразии видов полученная информация является очень разнообразной.

На протяжении XX века прикрепленный к поверхностям перифитон и видовой состав микроскопических водорослей поверхности донных отложений использовались в качестве биологических объектов при изучении состояния водоемов в Европе. За это время были разработаны различные индексы для определения сапробности (при загрязнении органическими веществами и при сбросах сточных вод) и определено огромное количество видов-индикаторов качества воды.

Экологическая информация, касающаяся диатомовых пресных водоемов, собрана в единую базу данных (OMNIDIA2; Lecoite ym. 1993; В системе Интернет: <http://perso.club-internet.fr/clci/>), там же можно найти и различные индексы качества воды. Программа высчитывает относительную встречаемость каждого вида, и основываясь на показаниях индикатора с помощью уравнения Зелинки и Марвана (1961), используя следующие индексы качества воды, отражающие избыток органического вещества:

- Индекс Слейдсека (1986);
- индекс Дески (1979);
- индекс Стейнберга и Шифеля (1988);
- индекс Ватанаба и др. (1986, 1990);
- индекс Леклерка и Мако (1988);
- индекс IPS (Coste CEMAGREF, 1982);
- родовой индекс GDI (Coste ja Ayphassorho, 1991);
- индекс CEE (Descy ja Coste, 1991).

Для измерения содержания питательных веществ в воде разработан специальный диатомовый индекс трофности (TDI = Trophic Diatom Index; Kelly и Whitton, 1995), частично отражающий, в случаях повышенного уровня трофности, избыток органического вещества.

В условиях Финляндии наиболее употребительными для определения избытка органического вещества стали индекс IPS, индекс рода (GDI), а также индекс TDI, который отражает содержание питательных веществ.

В дополнение к перечисленным при анализе для сравнения мест отбора проб получают оценки величины рН воды, сведения о видовом разнообразии, вычисленные с помощью трех уравнений (Хоканссон, 1993), а также различные экологические оценки о соотношении видов:

- биотопы и подразделения живых организмов на группы (Denys, 1991);
- связь с течением воды (Denys, 1991);
- уровни трофности (Hofmann, 1994);
- классы сапробности (Hofmann, 1994);
- классы по устойчивости к загрязнению (Lange-Bertalot, 1979 b);
- деление на классы по экологическим требованиям в отношении следующих факторов (van Dam ym. 994):
 - рН, кислотно-щелочной баланс;
 - содержание в воде солей;
 - тип метаболии;
 - требования к содержанию кислорода;
 - сапробность;
 - уровень трофности;
 - влажность – часть видов относится к обитающим в почве.

База данных регулярно обновляется, создаются новые классификации. Таким образом, сразу же после анализа пробы под микроскопом в течение нескольких минут можно получить важную информацию о качестве воды.

В европейских странах сделаны важные заключения и выводы, связанные с использованием диатомовых водорослей в мониторинге состояния водных объектов. Ниже представлены некоторые рекомендации по отбору проб:

- в том случае, если на станции отбирают пробы воды, то удаленность от станции до места отбора проб водорослей не должна превышать 100 метров. Это условие необходимо выполнять для изучения влияния качества воды на состав водорослей;
- во время первого отбора проб необходимо сделать подробное описание станции / места отбора проб (специальный бланк полевой журнал). Позднее, т. е. во время следующих отборов проб следует фиксировать лишь изменения условий (уровень воды, отклонение течения и др.);
- координаты станции должны быть четко обозначены, для того чтобы другой исследователь при необходимости мог бы быстро ее найти (в современных условиях с помощью прибора GPS);
- полевой журнал должен тщательно заполняться при каждом посещении станции, для того чтобы полученные в разное время сведения можно было сравнивать между собой;
- в полевом журнале необходимо указать, по крайней мере, следующее:
 - имя и фамилия исследователя, выполняющего отбор пробы;
 - глубина и ширина русла реки;
 - описание состояния дна;
 - видовой состав ленточных водорослей и крупных растений;
 - особенности условий затененности станции прибрежной растительностью;
 - время, прошедшее с момента последнего подтопления / затопления или разлива воды.

2.6.3.2

Выбор места исследований

При выборе места наблюдения необходимо учитывать следующие факторы:

- камни, с которых счищают щеткой пробы, должны быть репрезентативные, ни в коем случае просто произвольные или случайные (для сравнения – отбор проб беспозвоночных бентоса);
- поскольку освещенность и другие условия могут оказывать влияние на структуру сообщества, изменяя их реакцию на загрязнение, то сравниваемые в будущем образцы следует отбирать в местах с одинаковой освещенностью. Следует избегать сильно затененных мест, если только эти условия не являются наиболее свойственными

исследуемому водоему. Также не подходят для проведения наблюдений и места вблизи резких береговых склонов или непосредственно у границы воды;

- камни, с которых предполагается отбор проб, должны быть покрыты водой не менее месяца (точно такое же требование предъявляется и для отбора проб с искусственных поверхностей). Наиболее оптимальная глубина составляет 20 см, но если есть уверенность в том, что камень находился под водой необходимое время, глубина может быть и меньше. Она может быть и большей (□ 50 см), если дно в этом месте хорошо освещено, т. е. находится в пределах фотического слоя;
- изменения скорости течения от 0,1 до 1,6 м/с не влияют на расчеты индексов, однако мест с быстрым течением следует избегать и с точки зрения безопасности.

Выполнение указанных рекомендаций поможет и во время отбора проб из водоемов со слабым течением. В них осадкообразование более интенсивно, чем эрозия, поэтому и на поверхности камней образуется тонкий слой донных отложений. В таких водоемах пробы лучше отбирать с вертикальных твердых поверхностей, которые могут быть выполнены из подходящего материала.

2.6.3.3

Время проведения исследований

Пробы следует отбирать, по меньшей мере, один раз в год в период наиболее низкого уровня воды, когда в большей степени сказывается влияние сточных вод. В период сильного течения отбор проб усложняется, порой становится опасным. Результаты расчетов индексов, полученные с одного места, мало изменяются в период с мая по октябрь, однако они отражают изменения качества воды, вызванные уменьшением течения в период низкого уровня воды. В теплой воде летом структура сообществ меняется быстрее, чем в холодной зимой. В качестве общей рекомендации можно привести следующее: отбор проб по программе мониторинга можно проводить через 4 недели после паводка (весенний паводок, подтопления, вызванные обильными дождями).

2.6.3.4

Выбор поверхности

Отбор проб диатомовых с камней и других твердых и жестких поверхностей по ряду причин является наиболее продуктивным методом в программах мониторинга во всей Европе:

- подобные поверхности / субстраты есть практически во всех водоемах;
- качество камней в разных водах является различным, и хотя оно оказывает некоторое влияние на сообщества, его можно не принимать во внимание при изучении структуры сообществ и при анализе другой полученной информации
- отбор проб относительно несложен;
- изменчивость наиболее важных индексов, рассчитанных на основе анализа диатомей/ диатомовых, достаточно хорошо изучена.

В целом камни являются наиболее подходящим субстратом, однако в водах, богатых питательными веществами, камни, покрытые нитчатými водорослями, можно «обработать» под программу наблюдений. Если все же нет подходящих естественных поверхностей, то можно использовать искусственные. При их использовании необходимо помнить следующее:

- время экспонирования на свету должно быть достаточно продолжительным (не меньше четырех недель, а в олиготрофных или очень затененных местах – дольше);
- при проведении наблюдений, учитывая будущие сравнения, время экспонирования должно быть одинаковым;
- несмотря на то, что гладкие стеклянные и жесткие пластиковые пластинки были очень популярны в недавнее время, теперь рекомендуется использовать матовые, неровные поверхности. Для этих целей подходят керамические плитки без глазури или прикрепленный к свае полипропиленовый канат, конец которого распущен на отдельные волокна;
- пластины нужно устанавливать так, чтобы они не привлекали внимания и не оказались на пути движения лодок;
- использование искусственных поверхностей предполагает проведение предварительного исследования до начала программы систематического мониторинга;
- оценка результатов, полученных на искусственных поверхностях, требует подробного описания используемого метода (в идеальном случае – выполняют сравнение с результатами, полученными в том же месте, но на естественных поверхностях).

Если планируется отбор проб эпифитона, то необходимо помнить, что растущие на водном мхе, на трубчатых и подводных растениях сообщества диатомовых, очень отличаются и по времени, и пространству. Если макрофиты находятся всегда под водой (например, какой-либо из видов *Batrachium*), то их эпифитическое сообщество можно использовать в мониторинге без вышеуказанных трудностей. В некоторых исследованиях значения качественных индексов диатомовых были несколько выше по пробам собранных с поверхности растений по сравнению с пробами, полученным с камней. В исследованиях, выполненных в прибрежной полосе на юге Финляндии, более высокие индексы были получены для проб, взятых с растений.

2.6.3.5

Отбор проб с камней

Пробы предпочтительнее собирать с камней диаметром 10–15 см, на одном участке должно быть не менее пяти камней. Если на дне нет таких крупных камней, то отбирают пробы с большего числа мелких камней. В водоемах со скудной первичной продукцией гетерогенность выше, чем в эвтрофных водах, поэтому в олиготрофных водоемах проб нужно отбирать больше.

Индексы качества воды, рассчитываемые по диатомовым, определенным образом связаны с относительной многочисленностью видов. Нет постоянной необходимости отбирать пробы для оценки их численности. Пробы счищают щеткой с верхней части камня. Доказано, что видовой состав изменяется довольно значительно в зависимости от нахождения микробиотопа относительно течения.

Для отбора проб рекомендуется использовать щетку с жесткой щетиной (например, зубная щетка), но не нож, так как щетина меньше повреждает диатомовые. Щетка, кроме того, лучше снимает клетки с неровной поверхности камня. Нож может лучше подойти для жестких, гладких поверхностей, и его легко чистить между отдельными отборами проб. Прежде чем приступить к отбору новой пробы, щетку необходимо всегда тщательно очищать.

Если на камнях много ленточных водорослей, то в соответствии с французской методикой выбирают камни с наименьшим количеством лент, после чего ленты осторожно разделяют руками, а затем щеткой отбирают пробы диатомовых.

В одном из возможных вариантов пробы диатомовых отбирают вместе с ленточными водорослями, так как многие виды диатомовых растут как эпифиты на поверхности макроводорослей. Значительной разницы в оценке индекса загрязненности или эвтрофикации водоема на основании проб, взятых с камней и с макроводорослей, нет.

2.6.3.6

Лабораторная обработка

Перед тем как приступить непосредственно к изготовлению препаратов и дальнейшей обработке проб, рекомендуется под микроскопом быстро оценить количество пустых оболочек диатомовых.

Если обработка проб происходит сразу же после их отбора, то консерванта добавлять не надо. Например, деление клеток можно предотвратить или замедлить, поместив пробу в темное и холодное место. Законсервировать образец можно, заморозив его, либо поместив в спирт, нейтральный раствор Люголя или нейтральный формалин. При использовании фиксирующих средств необходимо соблюдать технику безопасности. Название консервирующего вещества / консерванта нужно четко указать на бутылке с пробой.

Основные этапы изготовления препаратов:

- прокаливанию для очистки от органического вещества выполнять не рекомендуется;
- некоторые исходные пробы необходимо хранить, по крайней мере, до тех пор, пока препараты не будут изготовлены и полностью изучены под микроскопом;
- при мокром сжигании проб рекомендуется обработка с пероксидом водорода, также можно использовать обработку кислотой;
- если пробы были отобраны с поверхности известняка, то для предотвращения образования солей кальция их следует предварительно обработать слабой кислотой;
- химикаты-окислители удаляют, обрабатывая образец в центрифуге, или путем осаждения;
- очищенную суспензию следует хранить для изготовления дополнительных препаратов, которые, возможно, потребуются в будущем (можно хранить первоначальную / исходную пробу);
- при изготовлении препаратов капля суспензии наносится на стекло, ее оставляют сохнуть при комнатной температуре. Второй вариант: каплю суспензии помещают на пластинку и

сушат при умеренной температуре (+ 60 °C). Суспензию можно развести в спирте, тогда оболочки водорослей расправятся равномернее, и капля высохнет быстрее;

- на подсохшую пробу капают одну каплю покровной смолы, коэффициент сгиба которой > 1,6 (Naphrax, Diphrax, Нутах); лишняя часть смолы испаряется с пластинки во время нагревания пробы;
- рекомендуемая плотность оболочек в пробе составляет примерно 10–20 штук диатомовых на один участок / сектор просмотра под микроскопом;
- из проб следует последовательно приготовить несколько препаратов для анализа и для хранения; серия, предназначенная для длительного хранения, помещается в особый гербарий. Препараты, в принципе, могут храниться неограниченно долго, поэтому этикетки должны быть выполнены из прочного материала и тщательно заполнены; наклейки должны быть приклеены долговечными надежным клеем, а надпись выполнена водостойким фломастером или маркером.

Литература

- CEMAGREF 1982. Etude des méthodes biologiques quantitatives d'appréciation de la qualité des eaux. Rapport Division Qualité des Eaux Lyon. Agence financière de Bassin Rhone – Méditerranée. Corse, Pierre-Bénite. 218 pp.
- CEMAGREF 1984. Opération Seine rivière propre. Evaluation de la qualité hydrobiologique: poissons-diatomées. Rapport A.F.B. Sine-Normandie, Conseil Régional Ile de France. 35 pp.
- Coste, M. and Ayphassorho, H. 1991. Etude de la qualité des eaux du Bassin Artois-Picardie à l'aide des communautés de diatomées benthiques (Application des indices diatomiques). Rapport Cemagref, Bordeaux – Agence de l'Eau Artois-Picardie, Douai. 227 pp.
- Coste, M., Bosca, C. and Dauta, A. 1991. Use of algae for monitoring rivers in France. In: Whitton B. A., Rott, E. and Friedrich, G. (eds.) Use of algae for monitoring rivers. Institut für Botanik, Universität Innsbruck, Innsbruck. 75–88.
- Dell'Uomo, A. 1991. Use of benthic macroalgae for monitoring rivers in Italy. In: Whitton, B. A., Rott, E. and Friedrich, G. (eds.) Use of algae for monitoring rivers. Institut für Botanik, Universität Innsbruck, Innsbruck. 129–137.
- Denys, L. 1991. A check-list of the diatoms in the holocene deposits of the Western Belgian coastal plain with a survey of their apparent ecological requirements. II. Centrales. Ministère des Affaires Economiques. Service Géologique de Belgique. 41 pp.
- Descy, J. P. 1979. A new approach to water quality estimation using diatoms. Nova Hedwigia/ Beiheft 64: 30–323.
- Descy, J. P. and Coste, M. 1989. Application D'un nouvel indice diatomique (indice CEE 88) au Réseau National de Bassin Rhone-Méditerranée-Corse. Rapport A.F.B Rhone-Méditerranée-Corse. 86 pp.
- Descy, J. P. and Coste, M. 1991. A test of methods for assessing water quality based on diatoms. Verh. Internat. Verein. Limnol. 24: 2112–2116.
- Eloranta, P. 1982. Periphyton growth and diatom community structure in a cooling water pond. Hydrobiologia 96: 253–265.
- Eloranta, P. 1991. Use of algae for monitoring rivers in Finland. In: Whitton, B. A., Rott, E. and Friedrich, G. (eds.) Use of algae for monitoring rivers. Institut für Botanik, Universität Innsbruck, Innsbruck. 71–74.
- Eloranta, P. 1995. Type and quality of river waters in central Finland described using diatom indices. In: Marino, D. and Montresor, M. (eds.) 13th Internat. Diatom Symposium 1994, Acquafredda di Maratea, Italy. 271–280.
- Eloranta, P. and Andersson, K. 1996. Diatom indices in water quality monitoring of some South-Finnish rivers. Proceed. Internat. Assoc. Limnol. 26.
- Eloranta, P. and Kunnas, S. 1979. The growth and species communities of the attached algae in a river system in central Finland. Arch. Hydrobiol. 86 (1): 27–44.

- Eloranta, P. and Kunnas, S. 1982. Periphyton accumulations and diatom communities on artificial substrates in recipients of pulp mill effluents. *Biol. Res. Rep. Univ. Jyväskylä* 9: 19–33.
- Håkansson, S. 1993. Numerical methods for the inference of pH variations in mesotrophic and eutrophic lakes in Southern Sweden. – A progress report. *Diatom Res.* 8 (2): 349–370.
- Hofmann, G. 1994. Aufwuchs Diatoms in Seen und ihre Eignung als Indikatoren der Trophie. *Bibliotheca Diatomol.* 30. 241 pp.
- Lange-Bertalot, H. 1979a. Pollution tolerance of diatoms as a criterion for water quality, estimation. *Nova Hedwigia/Beiheft* 64: 285–304.
- Lange-Bertalot, H. 1979b. Toleranzgrenzen und Populationsdynamic benthischer Diatomeen bei unterschiedlich starker Abwasserbelastung. *Arch. Hydrobiol./Suppl.* 56 (Algol. Studies 23): 184–219.
- Leclercq, L. and Maquet, B. 1987. Deux nouveaux indices diatomique et de qualite chimique des eaux courantes. Comparaison avec differents indices existants. *Cah. Biol. Mar.* 28: 303–310.
- Leclercq, L. and Maquet, B. 1987. Deux nouveaux indices chimiques at diatomique de qualite d'eau courante. Application au Samson et à ses affluents (bassin de la Meuse belge). Comparaison avec d'autres indices chimiques, biocénotiques et diatomiques. Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique, document de travail 28. 113 pp.
- Lecointe, C., Coste, M. and Prygiel, J. 1993. "Omnidia": software for taxonomy, calculation of diatom indices and inventories management. *Hydrobiologia* 269/270: 509–513.
- Prygiel, J. and Coste, M. 1993. Utilisation des indices diatomiques pour la mesure de la qualité des eaux du bassin Artois-Picardie: bilan et perspectives. *Ann. Limnol.* 29 (3–4): 255–267.
- Round, F. E. 1993. A review and methods for the use of epilithic diatoms for detecting and monitoring changes in river water quality 1993. HMSO.
- Sladeczek, V. 1986. Diatoms as indicators of organic pollution. *Acta hydrochim. hydrobiol. Dresden* 14: 555–566.
- Steinberg, C. and Schiefele, S. 1988. Biological indication of trophy and pollution of running waters. *Z. Wasser- Abwasser-Forschung* 21: 227–234.
- Van Dam, H., Mertens, A. and Sinkeldam, J. 1994. A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from the Netherlands. *Netherlands J. Aquatic Ecol.* 28 (1): 117–133.
- Watanabe, T., Asai, K. and Houki, A. 1986. Numerical water quality monitoring of organic pollution diatom assemblages. *Proceedings of the 9th International Diatom Symposium*: 123–141.
- Watanabe, T., Asai, K. and Houki, A. 1990. Numerical simulation of organic pollution in flowing waters. In: Chereginoff, P. (ed.) *Encyclopedia of Environmental Control Technology, 4. Hazardous Waste Containment and Treatment*, Gulf Publishing Company, Houston. 251–284.
- Zelinka, M. and Marvan, P. 1961. Zur Präzisierung der biologischen Klassifikation der Reinheit fließender Gewässer. *Archiv für Hydrobiologie* 57: 389–407.

Стандарты

- EN 13946:2003; Water quality–Guidance Standard for the routine sampling and pretreatment of benthic diatoms from rivers.
- EN 14407:2003; Water quality–Guidance standard for the identification, enumeration and interpretation of benthic diatom samples from running waters.

2.6.4

Определение перифитона на искусственных субстратах

Сирпа Херве, Центр окружающей среды Центральной Финляндии (sirpa.herve@ymparisto.fi),
Пертти Хейнонен, Институт окружающей среды Финляндии (pertti.heinonen@ymparisto.fi)

2.6.4.1

Общие сведения

Для изучения растительности на поверхностях наряду с естественными субстратами можно использовать и искусственные. Такими являются, например, стеклянные палочки, стеклянные пластинки, различные пластмассовые материалы и керамические пластины. Положительной стороной данного метода является то, что перифитон можно исследовать в любой части водоема вне зависимости от того, какое дно находится на участке наблюдения. Преимуществом метода является также возможность приведения к единому стандарту факторов, влияющих на появление растительности, что дает хорошие предпосылки для проведения сравнения роста перифитона. Недостатком можно считать возможную селективность поверхности в качестве субстрата для выращивания водорослей. Данный метод применяется с 1980-х годов во многих исследованиях рек и озер, в том числе и в рамках биологического мониторинга водоемов.

2.6.4.2

Оборудование

Выращивание перифитона происходит с использованием специальных штативов. Для исследований рек и озер разработан особый тип штатива. В речной модели (рис. 1) пять пластин подвешены параллельно и по течению. В озерной модели (рис. 2) восемь пластин подвешены радиально. Штативы можно установить с помощью поплавков и грузил на желаемую глубину. Во время исследований штативы необходимо тщательно очищать после каждого периода выращивания. Это следует делать и в случае исследований на одном и том же месте. В качестве поверхности для выращивания перифитона используется прозрачная твердая пластина из поликарбоната. Рекомендуемый размер пластины 150 x 100 x 2 мм. Этот размер подходит также для исследований в олиготрофных водоемах.

Подготовленные для установки пластины необходимо тщательно вымыть и прополаскать в лабораторных условиях. Оставшиеся после нарезки пластин шероховатости нужно зачистить, так как они неравномерно собирают перифитон и являются источником погрешности.

Пластины являются одноразовыми. Их нельзя использовать еще раз, так как даже очень аккуратное удаление перифитона и взвешенных веществ неизбежно приводит к царапинам на поверхности пластика, к изменению условий роста и прикрепления растительности.

Для установки штатива требуются поплавок, якоря и прочная нейлоновая веревка, специальные пакеты для заморозки, используемые для транспортировки и хранения пластин-инкубаторов, водостойкий маркер для пометки образцов, сумка-холодильник и аккумуляторы холода, необходимые для перевозки проб. Также требуется гидрологическая вертушка для измерения скорости течения и обычное оборудование для отбора проб воды.

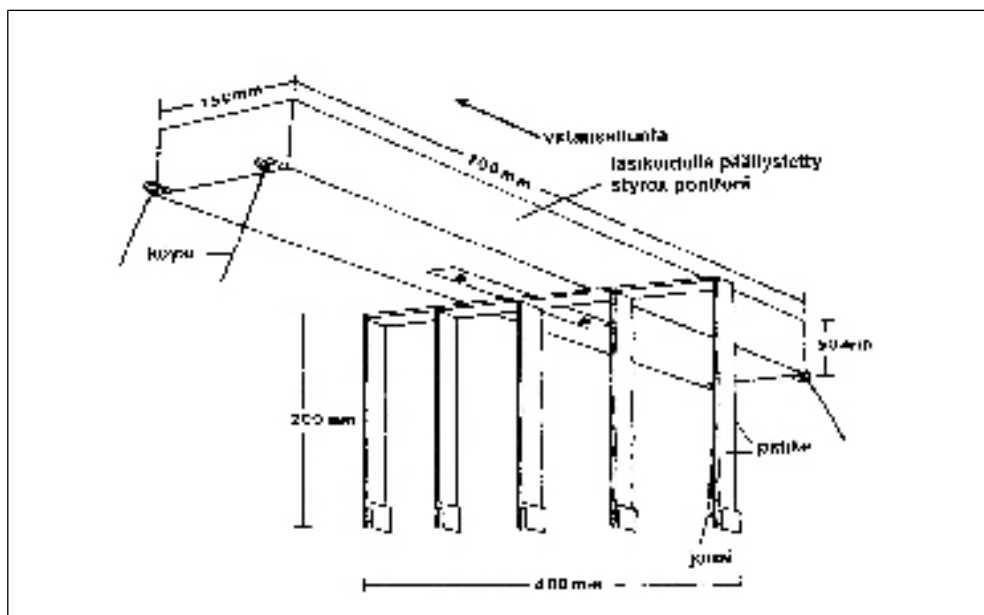


Рис. 1. Штатив для выращивания перифитона в речных условиях.

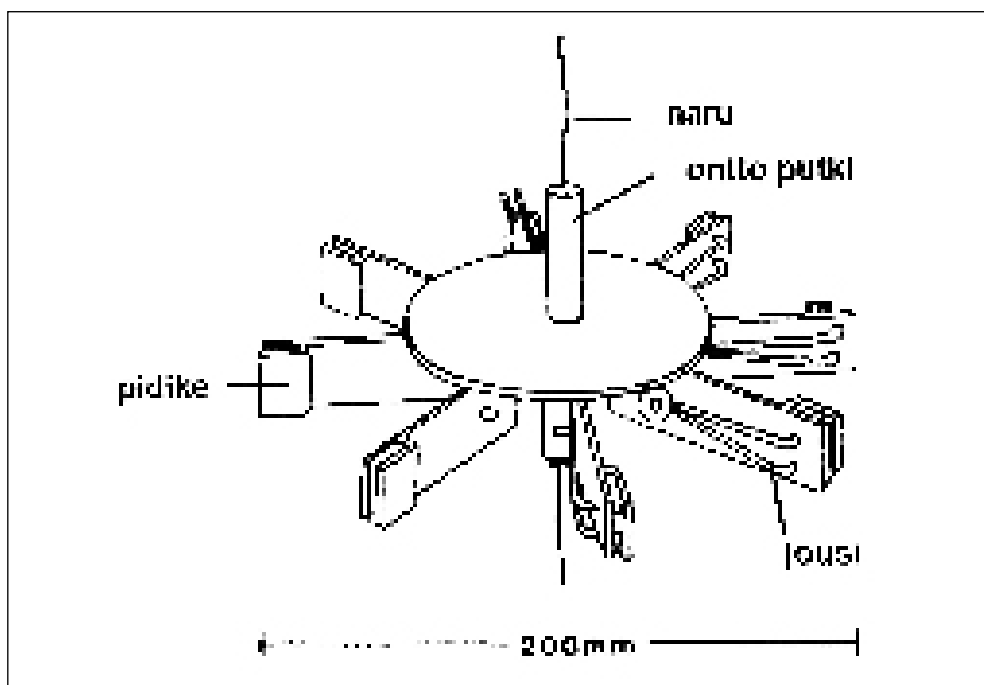


Рис. 2. Штатив для выращивания перифитона в озерных условиях.

2.6.4.3

Инкубация

В проточной воде важными факторами, оказывающими влияние на рост перифитона, являются скорость течения, освещенность места (высота берега, прибрежная растительность, географическое положение и т. д.), глубина и качество дна. Для получения сравнимых результатов все вышеперечисленные условия необходимо учитывать при выборе места наблюдения. Глубина выращивания перифитона в речной воде зависит от глубины реки и составляет 0,5–1,0 м. Рекомендуемая скорость течения 0,2–0,3 м/с. Скорость течения измеряется в нескольких местах на глубине установки пластин.

Участок для инкубации в озерах необходимо выбирать с учетом факторов, влияющих на рост перифитона. В литоральном поясе место инкубирования необходимо помещать за пределы зон хелофита / хелофитов и нимфеид и так, чтобы длинные побеги подводных растений (например, *Potamogeton*) не проникли на конструкции штативов.

Наиболее приемлемая глубина в озерах – 1 метр. Штативы можно монтировать на один трос одновременно на разных глубинах, тогда мы получим картину различий в росте перифитона по вертикали. При выборе глубины необходимо учитывать, с одной стороны, температурную стратификацию в водоеме, а с другой стороны, прозрачность воды в месте расположения штатива. На рост перифитона отводится ровно три недели (21 сутки). В реках и водоемах с быстрым течением штативы необходимо проверять раз в неделю. Одновременно можно замерять и скорость течения.

По окончании времени инкубации штативы поднимают из воды и осторожно освобождают, так, чтобы возможно обильный слой перифитона остался целым и невредимым, и сразу помещаются в пакеты для заморозки (1 пластина в 1 пакет). Воду в пакеты не добавляют. Пакеты транспортируются защищенными от света, желателен сумка-холодильник, где резервуары-аккумуляторы холода поддерживают низкую температуру в течение долгого времени. Во избежание проливания пакеты необходимо транспортировать в вертикальном положении.

Штативы нужно вымыть сразу же в полевых условиях, так как некоторые растения при высыхании очень плотно прикрепляются к поверхности. Пробы воды рекомендуется отобрать до и после инкубирования. Рекомендуемый список определяемых параметров, необходимых при анализе перифитона: температура, мутность, рН, цветность, концентрация общего азота, NH₄-N, общего фосфора и хлорофилла «а». Важно измерить глубину прозрачности, общую глубину в месте инкубации, а также сделать заметки о наличии слизи на берегах, о другой растительности и, возможно, отметки об изменениях макрофитов / высшей водной растительности, произошедшие за время инкубации.

2.6.4.4

Анализ проб

Анализ перифитона следует начинать непосредственно по завершении инкубирования. При необходимости образцы можно законсервировать замораживанием, не более чем на месяц. Обработка в целях возможного дальнейшего сопоставления должна вестись единообразно.

В лаборатории перифитон отделяют с поверхности пластины с помощью пластикового скребка (из того же материала, что и пластина) и одновременно поливая дистиллированной водой. Отделенный перифитон разбавляют до нужного объема (обычно 300–1000 мл).

Анализируется весь прикрепившийся к пластине материал (за исключением улиток, пиявок, личинок и т. п.). Перед началом анализа пробу перифитона, тщательно взбалтывая, стремятся сделать максимально однородной. Проба на перифитон анализируется с помощью обычных стандартных гидрохимических методов определения хлорофилла «а» (мг/м²) и взвешенного вещества (г/м²). Если есть основания предполагать, что мутность воды влияет на результат, то выполняют определение остатка и потерь при прокаливании. Кроме того, отбирают пробу для определения видового состава, которая консервируется как проба фитопланктона. Консервант необходимо добавить в бутылки как можно быстрее. Результаты записывают с точностью двух значащих цифр. При содержании хлорофилла «а» менее 1 мг/м² результат указывают с точностью десятых долей миллиграмма. В результатах необходимо сделать отметку о том, что проба была заморожена.

Проводя исследования перифитона, необходимо фиксировать все особые обстоятельства опыта (например, записи о смещении штативов, загрязненность пластин или отрыв перифитона и т. д.). Прикладываются результаты всех попутно проведенных анализов и измерений, по которым рассчитывается среднее значение. Если в отдельных результатах наблюдается большая дисперсия, то рекомендуется использовать средние значения / медиана.

Литература

- Heinonen, P. and Herve, S. 1984. A rapid biological method for the monitoring of eutrophication. Arch. Hydrobiol. 101, 1/2: 135–142.
- Heinonen, P., Paasivirta, J. and Herve, S. 1986. Periphyton and mussels in monitoring chlorhydrocarbons and chlorophenols in watercourses. Toxicological and Environmental Chemistry 11: 191–201.
- Herve, S. and Heinonen, P. 1984. Factors affecting the chlorophyll a assay of phytoplakton samples during transport and analysis. Ann. Bot. Fennici 21: 17–20.
- Jarlman, A., Bengtsson, R., Lindström, E.-A. and Eloranta, P. (Nordic Phytoplankton and Periphyton Group, NPPG) 1996. Periphyton, Nordic standard for assessment of environmental quality in running water. B: Screening method.

2.6.5

Образование слизи на экспериментальной сети

Сирпа Херве, Центр окружающей среды Центральной Финляндии, Пергги Хейнонен, Институт окружающей среды Финляндии

2.6.5.1

Общие сведения

Появление слизи на рыболовных сетях и других вертикально устанавливаемых снастях для лова рыбы является следствием эвтрофикации водоемов. Особенно на начальной стадии изменения трофического статуса водоема появление слизи на сетях, мостках и причалах является первым сигналом, на который обращают внимание местные жители и рыболовы. С помощью описанных выше методов работы с перифитоном можно определить и интенсивность появления слизи в прибрежной зоне.

Однако для описания появления слизи на сетях метод исследования перифитона не подходит, так как причиной ослизнения чаще всего являются особые виды водорослей, которые из-за цепочного строения запутываются в волокнах сети. Лучшим способом изучения слизи на сетях является имитация или моделирование рыболовного процесса. Закрепленную на стандартном каркасе опытную (экспериментальную) сеть с заданным размером ячеек опускают на желаемую глубину; измеряется появление слизи через определенное время на основании результатов, полученных при анализе взвешенных веществ и содержания хлорофилла «а».

2.6.5.2

Оборудование

Для изучения процесса появления слизи на опытной сети необходим жесткий каркас, на который туго натягивается сеть. Каркас размером 0,5 x 0,5 м изготавливается из нержавеющей металлической проволоки. На практике хорошо зарекомендовала себя модель каркаса с приваренными, выступающими наружу шипами (длиной 10–15 мм, по 2 шт. на каждой стороне, плюс по одному в углах), к которым прикрепляется опытная сеть (рис. 1). На каркасе есть прочные кольца для прикрепления якоря и поплавков.

Размер ячеек опытной сети может соответствовать размеру ячеек сети, используемой при рыбной ловле в данном водоеме. Одновременно для получения контрольной пробы необходимо инкубировать и контрольную (из крученого нейлона) сеть с ячейей 12 мм.

2.6.5.3

Инкубация

До инкубации сеть тщательно промывается дистиллированной водой, высушивается при +60°C в течение 2 часов и взвешивается после охлаждения в эксикаторе на аналитических весах с точностью до 1 мг. Опытные сети маркируют, например, пленкой с выпуклыми буквами, которая выдерживает температуру обработки. Пленки прикрепляют таким образом, чтобы их можно открепить во время взвешивания. Время, место и глубина инкубации опытной сети могут быть такими же, которые обычно используются при рыбной ловле. Сеть на каркасе помещают с помощью грузил и поплавков на желаемую глубину. Всегда следует устанавливать и контрольную сеть (ячейка 12 мм). Она устанавливается на глубине 1 м (от верхнего края каркаса). Эта глубина всегда применяется, если нет каких-либо особых требований. Результаты, полученные на этой глубине, могут быть использованы при проведении сравнения с другими водоемами. Общая глубина водоема должна быть не менее 6 м. При исследовании на мелких озерах этот метод неприменим, так как волны поднимают со дна взвеси, которые мешают измерениям.

При сравнении результатов, полученных на разных водоемах, необходимо уделять особое внимание расположению опытных сетей и мест наблюдения. Необходимо стремиться к получению сходных условий установки сетей. Важными факторами при этом являются площадь и форма акваторий, а также открытость водоема воздействию ветра и возможные течения в нем. Следует помнить, что изменения погоды (волны, течения, увеличение количества взвешенных веществ и т. д.) приводят к разбросу результатов. Каркасы с прикрепленной сетью устанавливают так, чтобы один поплавок, плотно присоединенный к каркасу, удерживал бы его на заданной глубине, а второй отмечал бы местонахождение прибора. В этом случае воздействие волн будет минимальным, а результаты сопоставимы.

Время инкубации контрольной сети должно составлять одни сутки (± 2 ч). Если в программе есть моделирование процесса рыбной ловли, то часть сетей можно выдержать под водой и дольше. Результаты, полученные за одни сутки, используют при сравнении результатов разных мест наблюдения. После инкубации сети поднимают и осторожно снимают с каркаса. В полевой журнал заносятся все замечания (особые погодные условия, прикрепившаяся к сети рыба и т. д.) Такие сведения в дальнейшем облегчают трактовку результатов. Сети, не высушивая, транспортируют в пластмассовых контейнерах с крышками в лабораторию, где незамедлительно приступают к их обработке (замораживать нельзя).

На последнем этапе полевых работ на глубине инкубации измеряют температуру и глубину прозрачности воды, отбирают пробы для определения мутности, цветности, содержания фосфора, хлорофилла «а».

2.6.5.4

Анализ проб

Сети промываются дистиллированной водой в течение 1–2 минут в емкости, где их транспортировали. Если сеть очень ослизнена, ее промывают второй порцией дистиллированной воды, и обе порции воды сливают. Объем слитой воды доводится до нужного (500–2000 мл), после чего определяют содержание взвеси и хлорофилла «а».

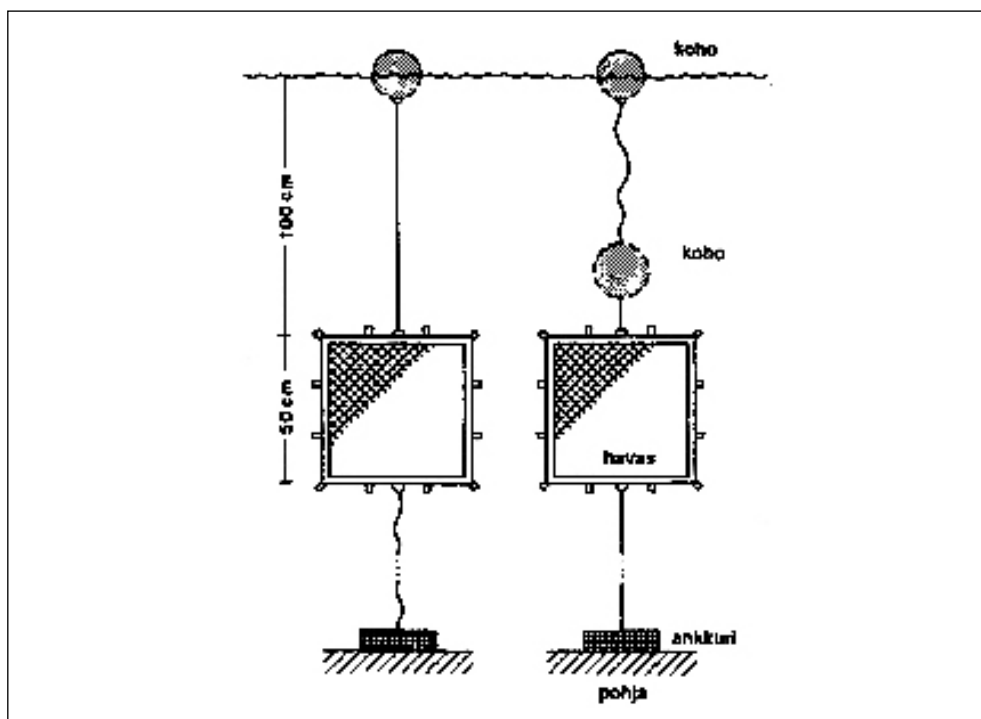


Рис 1. Штатив и схема выполнения инкубации сети

Также можно взять пробу видового состава, который консервируется как фитопланктон.

Если есть основания предполагать, что мутность воды оказывает значительное влияние на результат, целесообразно определить остаток и потери при прокаливании. Промытые сети сушат при температуре + 60 °С и затем взвешивают после охлаждения в эксикаторе (наклейки-метки на время взвешивания снимают).

Результаты сообщают в следующем виде: хлорофилл «а» – микрограмм/(г*сутки), взвешенное вещество – мг/(г*сутки). Вес сети определяют как среднее из двух результатов взвешивания, полученное до и после инкубации. Довольно часто эти результаты совпадают. Если разница оказалась значительной, то необходимо выяснить, вызвано ли это изношенностью сети, ее деформацией, или в сети после промывания осталось много взвешенных веществ.

К отчету прикладываются результаты всех параллельных опытов, рассчитывается средняя величина. Недостовверные результаты учитывать не нужно, и вместо средней оценки рекомендуется использовать расчет медианы.

Литература

Heinonen, P., Herve, S. and Yli-Karjanmaa, S. 1984. A method for estimation of sliming of nets in lake waters. *Aqua Fennica* 14, 1: 59–64.

2.7

Исследование водной растительности

2.7.1

Общие сведения

Под макрофитами, или крупными и высшими водными растениями, подразумевают полностью или частично приспособившиеся к водной среде сосудистые растения, мхи и крупные водоросли. Макрофиты можно классифицировать по-разному. Обычно их разделяют по способу или типу роста или произрастания. Таким образом, есть макрофиты, стебли которых находятся в воздухе, плавучие, подводные, донные, свободно плавающие, водные мхи и нитчатые водоросли.

Макрофиты «ответственны» за первичную продукцию в прибрежных водах. Они формируют условия для размножения, дают защиту и являются источником питания для множества организмов, а также и молоди видов, живущих в водоеме. Растительность, кроме того, защищает берег от разрушения, оказывает влияние на состояние дна. Деятельность макрофитов является важным фактором в биологическом и химическом равновесии водных экосистем. Понятие «растительный состав» подразумевает все видовое разнообразие определенной территории. «Растительность» в свою очередь означает весь растительный покров в целом.

В последние десятилетия проведено немало исследований, посвященных экологии водных растений, изучена их связь с различными факторами окружающей среды. Особенно исследованы вопросы эвтрофирования, влияния сточных вод промышленного и жилищно-

коммунального хозяйства. Изменения, происходящие в численности и размерах территорий, где растут макрофиты, легко наблюдать в естественных условиях, а также на аэрофотоснимках. Видовой состав макрофитов в Финляндии хорошо изучен, однако применялись разные способы составления карт и схем, это существенно усложнило сравнение результатов.

Появление макрофитов и развитие водной растительности является результатом воздействия множества факторов окружающей среды. Изменения отдельных факторов и условий состояния окружающей среды отражаются на качественных и количественных особенностях видового состава растений и растительного покрова. Группы растений по-разному реагируют на изменения в окружающей среде. Реакция происходит с различной скоростью в зависимости от способа роста и размножения видов, а также от продолжительности их жизненного цикла. Наиболее чутко реагируют на изменения в качестве воды растения, целиком от него зависящие (например, Lemna). Ассоциация элодеи (водяной чумы), обладающая слабыми корнями и бесполо размножающаяся, сильно разрастается в течение нескольких лет. В свою очередь растения, стебли которых находятся в воздухе, реагируют и имеют видимые изменения медленнее (в течение 5–20 лет), так как они не зависят от качества воды. Они получают окись углерода из воздуха, а питательные вещества из почвы. Многие макрофиты способны получать питательные вещества, как из воды, так и из донных отложений.

Изменение видового состава или растительного сообщества нельзя считать отражением только одного, определенного фактора окружающей среды, так как сразу несколько факторов оказывают влияние на водную растительность. Видовой состав макрофитов и водная растительность наилучшим образом характеризуют условия прибрежной полосы. В мелких водоемах изменения растительного вида-индикатора проявляются в лучшей степени, чем в крупных водоемах, в разных частях которых могут сформироваться различные видовой состав и растительный покров.

2.7.2

Методы

Водные растения можно использовать в качестве биоиндикаторов следующим образом:

- изменения в видовом составе и растительном покрове можно наблюдать с помощью аэрофотосъемки и/или путем составления карт растительности на выбранных линейных разрезах и опытных территориях;
- путем проведения тестов на растениях в контролируемых условиях лаборатории;
- в рамках исследований химического состава некоторых видов растений и/или при изучении устойчивости водных экосистем в условиях увеличения нагрузок.

Наиболее часто встречающиеся параметры при проведении исследования растительности:

- список видового состава;
- оценки количества / численности и особенности распространения растений, например, насколько часто определенный вид встречается;

- составление карт растительного покрова и выделение зон растительности;
- биометрические параметры видов и растительного покрова: плотность популяции, средняя и максимальная высота растений, биомасса.

Если есть необходимость в составлении карты водной растительности, то для достижения требуемой точности необходимо подготовить набросок карты по аэрофотоснимкам, который затем уточняется на местности. Аэрофотосъемку следует выполнять тогда, когда сосудистые растения и растения с плавающими на поверхности воды листьями достигают максимального размера. Аэрофотосъемку выполняют на высоте 750–1500 м под прямым углом к поверхности воды. Аэроснимки позволяют с небольшими затратами получить количественные оценки растительности и расположения растительного покрова.

С большой точностью, объединив аэрофотосъемку и картографирование, можно выделить растения, стебли которых расположены над водой, и плавающие на поверхности воды. С помощью карт растительности можно изучать изменения в растительном покрове или в развитии отдельных видов. Однако с точки зрения изучения мелких и подводных растений, возможности аэрофотосъемки ограничены.

Линейные разрезы (маршруты наблюдений) устанавливаются перпендикулярно к берегу. Разрезы проходят от уреза воды до той глубины, где встречаются макрофиты. Разрезы выбирают в таких местах, где есть возможность проведения наблюдений в течение нескольких лет. Направление разреза определяют по компасу или какому-нибудь природному ориентиру. Цель – сбор всех сведений о зонах растительности и всех изменениях, происходящих в растительном покрове: определяют зональность растительности и глубину произрастания, видовой состав и обилие / численность, распространенность вида в природе.

Наряду с разрезами на репрезентативном участке растительности можно поместить дополнительные приборы, например, устойчивый горизонтальный «экран», с помощью которого удобно следить за видовым составом водоема. Также необходимы и сведения о физико-химических показателях качества воды. Для работы в поле необходимо выбрать такой период лета, когда водная растительность становится наиболее обильной. В Финляндии таким временем считается период с середины июля до конца августа.

Как индикаторы качества воды крупные водные растения используются уже давно. Они хорошо подходят для долгосрочных программ мониторинга, так как многие из них реагируют на постоянные и четко выраженные изменения в состоянии водоема. Крупные растения занимают значительную часть в описании естественного состояния озер. В то же время речная растительность изучена хуже. До настоящего времени макрофиты широко не использовались в мониторинге состояния водоемов.

Литература

- Koskenniemi, E. 2000. Use and applicability of zoobenthic communities in lake monitoring. In: Heinonen, P., Ziglio, G. and Van der Beken, A. (eds.) *Hydrological and Limnological Aspects of Lake Monitoring: 105–117.*
- Nurmi, P. and Rissanen, J. 1999. Macrozoobenthos community structure and its relation to environmental variables in some Finnish lakes. Poster in *Nordic Benthological Meeting 9–12. September 1999, Jyväskylä.*

Skriver, J. ed. 2001. Biological monitoring in Nordic rivers and lakes. TemaNord 2001: 513. 109 pp.
Wiederholm, T. 1980. Use of benthos in lake monitoring. J. Water Pollut. Control. Fed. 52: 537–547.

Стандарты

EN ISO 28265: 1994; Water quality – Design and use of quantitative samplers for benthic macroinvertebrates on stony substrata in shallow waters (ISO 8265:1988).

EN ISO 9391: 1995; Water quality – Sampling in deep waters for macro-invertebrates – Guidance on the use of colonization, qualitative and quantitative samplers (ISO 9391:1993).

EN ISO 27828: 1994; Water quality – Methods of biological sampling – Guidance on handnet sampling of aquatic benthic macro-invertebrates (ISO 7828:1985).

EN ISO 5667-3 : 1996; Water quality – Sampling. Part 3: Guidance on the preservation and handling of samples (ISO 5667-3:1994).

EN ISO 8689-1: 2000; Water quality – Biological classification of rivers. Part 1: Guidance on the interpretation of biological quality data from surveys of benthic macroinvertebrates (ISO 8689-1:2000).

EN ISO 8689-2: 2000; Water quality – Biological classification of rivers: Part 2: Guidance on the presentation of biological quality data from surveys of the benthic macroinvertebrates (ISO 8689-2: 2000).

EN ISO 16665: 2005; Water quality – Guidelines for quantitative sampling and sample processing of marine soft-bottom macro fauna.

EN 14614: 2005; Water quality – Guidance standard for assessing the hydromorphological features of rivers.

EN 15196:2006; Water quality – Guidance on the sampling and processing of pupal exuviae of Chironomidae (Order Diptera) for ecological assessment.

2.8

Исследование зообентоса

Эса Коскенниemi (esa.koskeniemi@ymparisto.fi), Марья Руоппа, Институт окружающей среды Финляндии (marja.ruoppa@ymparisto.fi)

2.8.1

Общие сведения

Зообентос в течение многих лет успешно изучается для оценки биологического состояния озер, рек и морей. Он не меняет места своего обитания и его параметры, таким образом, отражают медленно происходящие изменения в большем объеме, чем другие методы, основанные на описании ситуации в момент отбора пробы. Изучение зообентоса входило в исследовательские программы уже с 1970-х годов. Мониторинг состояния зообентоса выполняется через определенный промежуток времени на многих загрязненных водоемах. В 1989 году начался государственный мониторинг зообентоса на 24 озерах. Цель исследований – изучение влияния долгосрочных и глобальных изменений в окружающей среде и сбор материалов для анализа состояний сравнительно чистых озер. В сотрудничестве со скандинавскими коллегами были исследованы особенности распределения зообентоса и определены возможности использования бентоса в мониторинге состояния рек.

В настоящее время исследование зообентоса является частью других исследований окружающей среды для определения масштабов и пространственных особенностей экологических изменений. Зообентос разделяют на группы по следующим особенностям:

структурные свойства, группирование по способу питания (functional feeding groups, функциональная таксономия), по требованиям к условиям обитания, а также по природно-географическим условиям. При трактовке результатов используются экологические особенности групп зообентоса или определенных видов. Параметры, описывающие зообентос, можно сравнивать с параметрами, характеризующими первичную продукцию (например, хлорофилл «а»), содержание питательных веществ в воде и содержание кислорода.

Определение зообентоса, в том числе обитающего в различных географических районах, широко описано в литературе. Использование статистических данных о зообентосе позволило изучить множество временных и пространственных изменений, сделало возможным разработку моделей, с помощью которых выполняются оценки значения экологических параметров. На окончательный выбор методов исследований и мест отбора проб оказывают влияние несколько факторов. Это, в частности, цели исследования, особенности региона, тип водоема, степень загрязненности, а также обилие популяций зообентоса. Единство терминологии облегчает трактовку результатов исследований зообентоса. Обычно выбирается несколько мест отбора проб (или опытных площадок). С каждой площадки отбирают серию последовательных проб. Если в проточном водоеме отбор проб осуществляется на площади размером 10 x 10 м, для которой делается также подробное описание биотопа, то можно говорить об опытной площадке. В прибрежной зоне озер места отбора проб могут располагаться на одной линии через определенный интервал. В этом случае речь идет об опытной линии или разрезе, включающем в себя несколько опытных площадок и мест отбора проб.

2.8.2

Места отбора проб

Планирование сети опытных площадок имеет большое значение для успешного проведения исследования. Исследуемые площади определяются на местности с максимальной точностью для того, чтобы в будущем их можно было с уверенностью обнаружить. Стандартные методики дают рекомендации по привязке площадок. Рекомендуется использование приборов GPS.

Выбор и расположение места отбора проб зависит от задач исследования. При изучении влияния какого-либо фактора, в том числе антропогенного, условия на всех площадках реки должны быть одинаковыми, единообразными, по крайней мере, по интенсивности течения. На исследуемой территории, включая контрольный участок, единообразными должны быть растительность и структура дна. Однако если целью исследования является выявление численности отдельных представителей / популяций в видовом составе, то опытные площадки должны включать максимально разнородные условия. В озерах во время исследований зообентоса рекомендуется использовать глубоководные районы, профундальные области, а также и промежуточные глубины. В качестве обычной рекомендации можно указать, что площадку для отбора проб размещают в самом глубоководном районе озера, а также и на промежуточных глубинах. Для каждого конкретного озера, тем не менее, следует принять решение о количестве площадок, принимая во внимание размер глубоководной котловины. Отметим, что если на озере есть несколько глубоких мест, то их зообентос может существенно различаться.

Размещение места отбора проб в прибрежной, литоральной зоне озера необходимо тщательно продумать. Например, проводя исследование в местах с твердым дном или с определенным растительным покровом, придется ограничиться отбором проб для проведения только качественного и полуколичественного анализа. Качество и особенности дна необходимо учесть заранее. При классификации придонной фауны необходимо использовать стандарты в соответствии с требованиями Рамочной Директивы Европейского Союза по водной политике.

2.8.3

Отбор проб

В соответствии с требованиями стандартов пробы необходимо отбирать два раза в год: в марте – апреле, после таяния льда или в сентябре – октябре. Если необходимо ограничиться только одним отбором, то наиболее оптимальным является период сентябрь – октябрь. В водоемах с проточной водой весенний паводок может отодвинуть отбор проб вплоть до начала лета. Преждевременно отобранные образцы могут оказаться с тех мест, которые летом не покрыты водой. В связи с этим пробы в проточных водоемах лучше отбирать в сентябре – октябре. Для проведения исследований на озерах поздняя осень также подходит лучше, потому что, например, комары-дергуны в это время обычно уже откладывают личинки на дне. Пробы отбираются в разные годы в один и тот же сезон.

Количество проб

Наличие донной фауны зависит в определенной степени от факторов окружающей среды – от особенностей дна, его строения, скорости течения, количества донных водорослей и водной растительности. В местах с ровным дном фауна распределяется относительно равномерно. Процессы, которые происходят внутри водоема, можно познать на основе изучения изменчивости в результатах анализов проб, отобранных параллельно с однородных, экологически-одинаковых участков отражает. Знание о них необходимо для достоверного анализа проб, полученных в разных районах и в разное время. Если разброс показателей внутри района оказывается значительным, то статистически значимое выявление различий предполагает обработку большого количества контрольных и параллельных проб. Чем чаще берется параллельная проба, тем больше видов можно получить для анализа. Регистрация малочисленных и редких видов имеет особое значение, если на основе полученного материала необходимо оценить биоразнообразие. Многие виды-индикаторы донной фауны сами по себе встречаются редко. Поэтому рекомендуется отбирать не менее пяти параллельных проб. Если необходимо выяснить динамику плотности популяций и естественные изменения видового состава, пробы следует отбирать несколько раз в течение года и несколько лет подряд.

Пробоотборники

Пробы отбирают в соответствии со стандартами с использованием указанного в них оборудования. Любые отклонения от стандартов необходимо указывать в сопроводительных документах и отчетах. Методы отбора проб подразделяются на количественные и качественные. Наиболее

распространенным количественным методом при работе на реке является использование каркаса, ограничивающего различными способами участок дна, а также цилиндра и трубки, с помощью которых с максимальной осторожностью собирается материал дна. Самым простым в употреблении является дночерпатель Сурбера. Количественным способом можно считать, к примеру, и сбор донных камней (с измерением их общей площади), с которых животных осторожно снимают руками или щеткой.

Из качественных способов наиболее распространенным является применение ручной сети, сачок на ручке-черенке или «толчковая» сеть (engl. kick-net), которая особенно хорошо подходит для использования в мелких водоемах с разнотипным дном. Дно при этом взмучивается энергичными движениями ног, а донный материал с живыми организмами попадает в сачок. В более глубоких водах можно использовать различные донные «драги». При исследовании озер чаще всего применяется дночерпатель Экмана и трубчатый дночерпатель.

Просеивание пробы обычно выполняют сразу после отбора с помощью специально предназначенного сита, укрепленного на ведре или ящике. Чаще всего материал пробы сразу же и консервируется. Если консервирование в полевых условиях не выполняется, то до отправки в лабораторию пробы необходимо поместить в холод. Особое внимание нужно уделить соблюдению следующих требований:

- каждая параллельная проба обрабатывается отдельно от других (консервирование, определение вида, получение результатов);
- размер ячеек сита и сети должны быть правильными;
- пробы консервируются в 70-процентном спирте;
- консервирование проб выполняется в полевых условиях.

Описание биотопа или параметры окружающей среды

Важную роль в получении точных результатов играет регистрация условий окружающей среды. Если сообщества зообентоса двух участков отбора проб окажутся различными, без сведений о состоянии окружающей среды трудно определить, что является причиной – загрязненность водоема или различия условий обитания? Большую часть этих параметров можно выразить в числах, поэтому возможна и статистическая обработка материала. Все указанные сведения необходимо заносить при работе в поле в специально подготовленные бланки.

2.8.4

Лабораторные анализы

В лаборатории из проб выбирают макроскопические донные организмы. Каждую параллельную пробу обрабатывают отдельно. На этапе создания выборки организмов рекомендуется разделить их на более мелкие партии, это особенно касается образцов, взятых из проточных водоемов. Малочисленные виды необходимо собрать из всей пробы.

Затем выборка обрабатывается под микроскопом, определяется видовой состав пробы, за исключением некоторых групп, которые в зависимости от задач исследования рассматриваются в общем или неточном приближении. В озерных исследованиях личинки комаров и

малоштитинковые черви определяются по видам, так как в озерах фауна практически целиком состоит из этих групп и их индикативные свойства хорошо известны. Если определение видового состава выполнено небрежно, то адекватные выводы сделать практически невозможно. Правильное определение видового состава позволит выполнить анализ различных индексов и разнообразных переменных, которые будут характеризовать особенности экосистемы.

Чаще всего материал характеризуется по следующим позициям:

- общая плотность экземпляров;
- общая биомасса;
- число таксонов;
- биоразнообразие / диверситет (Shannon's diversity, Shannon, 1948);
- Chironomidae BQI (Wiederholm, 1980);
- CI (Paasivirta, 1989 а, за исключением T.lugens-t);
- плотность популяции Oligochaeta;
- Oligochaeta-BQI (Wiederholm, 1980);
- соотношение видов Oligochaeta / Chironomidae (за исключением Tanypodinae);
- плотность экземпляров реликтовых ракообразных;
- плотность личинок Chironomus.

Абсолютная плотность экземпляров варьирует и по времени, и по месту отбора проб. Ее считают достаточно грубым показателем изменений, произошедших в зообентосе. При возрастании уровня трофности плотность популяции обычно растет до определенной границы. С увеличением глубины водоема плотность популяции, как правило, снижается.

Признано, что уровень трофности водоема влияет на биомассу донной фауны, которая увеличивается так же, как и плотность популяции при эвтрофикации водоема. Необходимость определения биомассы зависит от цели исследования. В исследованиях озер следует определять общую биомассу, а еще лучше биомассу по группам. Измерение биомассы выполняют в соответствии с указаниями, данными в стандартах.

Учеными разработано несколько индексов биоразнообразия, отражающих многообразие видов зообентоса. Отправной точкой стала идея о том, что сообщество сбалансировано в большей степени, если оно более многообразно. Например, доказано, что сточные воды вызывают снижение биоразнообразия и уменьшение численности видов. С другой стороны, известно, что биоразнообразие может быть низким и в достаточно сбалансированных экосистемах, поскольку их некоторые виды успешно приспособились к однородной среде. Вместо показателей диверситета / биоразнообразия характеристикой многообразия теперь принято считать простой список видов, представляющий всю необходимую информацию. Многие абиотические и биотические факторы оказывают влияние на количество видов и таксонов. На основании результатов мониторинга можно сделать вывод о том, что биоразнообразие и количество таксонов не зависят от трофического уровня озера.

Литература

- Koskenniemi, E. 2000. Use and applicability of zoobenthic communities in lake monitoring. In: Heinonen, P., Ziglio, G. and Van der Beken, A. (eds.) Hydrological and Limnological Aspects of Lake Monitoring. 105–117.
- Nurmi, P. and Rissanen, J. 1999. Macrozoobenthos community structure and its relation to environmental variables in some Finnish lakes. Poster in Nordic Benthological Meeting 9–12. September 1999, Jyväskylä.
- Skriver, J. toim. 2001. Biological monitoring in Nordic rivers and lakes. TemaNord 2001: 513. 109 pp.
- Wiederholm, T. 1980. Use of benthos in lake monitoring. J. Water Pollut. Control. Fed. 52: 537–547.

Стандарты

- EN ISO 28265: 1994; Water quality – Design and use of quantitative samplers for benthic macroinvertebrates on stony substrata in shallow waters (ISO 8265:1988).
- EN ISO 9391: 1995; Water quality – Sampling in deep waters for macro-invertebrates – Guidance on the use of colonization, qualitative and quantitative samplers (ISO 9391:1993).
- EN ISO 27828: 1994; Water quality – Methods of biological sampling – Guidance on handnet sampling of aquatic benthic macro-invertebrates (ISO 7828:1985).
- EN ISO 5667-3: 1996; Water quality – Sampling. Part 3: Guidance on the preservation and handling of samples (ISO 5667-3:1994).
- EN ISO 8689-1: 2000; Water quality – Biological classification of rivers. Part 1: Guidance on the interpretation of biological quality data from surveys of benthic macroinvertebrates (ISO 8689-1:2000).
- EN ISO 8689-2: 2000; Water quality – Biological classification of rivers: Part 2: Guidance on the presentation of biological quality data from surveys of the benthic macroinvertebrates (ISO 8689-2: 2000).
- EN ISO 16665: 2005; Water quality – Guidelines for quantitative sampling and sample processing of marine soft-bottom macro fauna
- EN 14614: 2005; Water quality – Guidance standard for assessing the hydromorphological features of rivers.
- EN 15196:2006; Water quality – Guidance on the sampling and processing of pupal exuviae of Chironomidae (Order Diptera) for ecological assessment.

3 Биологические тесты

3.1

Общие сведения

Наряду с исследованиями, выполняемыми в полевых условиях, в дополнение к сведениям, полученным в результате отбора проб в биологических исследованиях состояния водоемов, можно применять некоторые опыты и тесты. Их выполняют как в полевых условиях, так и в лаборатории. Ниже приведено несколько примеров гидробиологических тестов.

3.2

Опыт инкубирования фитопланктона

Олли-Пекка Пиэтилайнен, Институт окружающей среды Финляндии
(olli-pekka.pietilainen@ymparisto.fi)

3.2.1

Общие сведения

Тесты с использованием водорослей имеют большое значение при оценке первичной продукции и продукции фитопланктона для оценки влияния сточных вод и при составлении прогноза эвтрофирования водоемов.

Значение питательных веществ, влияющих на первичную продукцию фитопланктона, можно изучать различными способами. Рост биомассы водорослей и ее изменения изучаются с помощью опытов, во время которых выполняют добавку питательных веществ непосредственно в изучаемом водоеме (*in situ*). С другой стороны, можно выполнять опыты и тесты с водорослями в лабораторных условиях, используя воду из водоема – объекта исследования. Инкубирование в стандартных условиях позволяет сохранять некоторые факторы, влияющие на первичную продукцию фитопланктона. Одновременно можно изменять и изучать параметры какого-либо одного выделенного фактора. Обычно довольно трудно оценить, насколько будут соответствовать результаты, полученные в лабораторных и естественных условиях. Поэтому до сих пор наиболее популярными являются опыты инкубирования *in situ*, поставленные на

участке исследования. Лабораторные способы инкубирования чистых популяций водорослей получили широкое распространение в мире.

3.2.2

Опыт инкубирования в лабораторных условиях

Для проведения тестов, отражающих потенциал роста водорослей, используются выращенные в лабораторных условиях чистые популяции водорослей, в частности, зеленой водоросли *Scenedesmus carpicornutum* и некоторые виды *Chlorella*. Пробы воды отбирают на исследуемом участке и транспортируют в лабораторию, где их фильтруют и стерилизуют. В самой простой форме в образец воды выпускается популяция водорослевая в чистом виде или с добавлением известных питательных веществ. Затем колбы / резервуары с пробами инкубируются при постоянной температуре и освещении. Рост водорослей в ходе опыта несколько раз измеряется подсчетом количества клеток. Продолжительность теста составляет чаще всего две недели. Результат выражается в единицах биомассы.

Образовавшаяся биомасса зависит от количества и сложных взаимосвязей питательных веществ водоема (например, в случае разной степени разбавления сточных вод). Тест AGP считается простым и эффективным способом определения доступного для биологических процессов количества питательных веществ. Тест позволяет оценить развитие процесса эвтрофикации водоема. Его можно применять для изучения лимитирующих биологические процессы питательных веществ.

3.2.3

Опыт с добавкой питательного раствора

Целью проведения опыта, в ходе которого происходит добавка питательных веществ, является определение влияния увеличения содержания азота и фосфора на количество биомассы фитопланктона (измеряется по изменению содержания хлорофилла «а»). Вторая задача опыта – изучение влияния различных фракций азота и фосфора, так как во время проведения опыта их концентрации изменяются в опытных резервуарах. С помощью этого опыта, а также, исследуя соотношения концентраций питательных веществ, можно оценить, какое вещество – азот или фосфор – является лимитирующим в каком-либо внутреннем водоеме. Изменяя время инкубирования, изучается влияние добавок азота и фосфора на процесс продукции фитопланктона в лабораторных условиях или на местности *in situ* («опыты в садке»).

Для проведения лабораторных опытов пробы воды, содержащие фитопланктон, берутся четыре раза в течение вегетативного периода. В массе, осевшей на сетке, определяется содержание хлорофилла «а». На опытном участке каждый раз измеряют температуру воды на разных горизонтах, определяют общую глубину и прозрачность. Пробы воды перевозят в лабораторию в защищенных от света канистрах. В лаборатории они хранятся в темном и прохладном месте не более суток до начала опыта.

Для проведения инкубирования в лаборатории вода разливается в колбы. Обычно опыт проводится в прозрачных 8-литровых бутылках из поликарбоната (6 литров пробы воды / 1

таймера имитируется естественный режим смены освещения. Обогащенная питательными веществами вода изготавливается из отфильтрованной через сеть воды изучаемого водоема или деионизированной воды. В качестве питательных добавок обычно используются аммонийный азот и фосфат фосфора. Количество питательных добавок определяется в каждом случае отдельно, с учетом содержания питательных веществ в исследуемом водоеме, а также принимая во внимание продолжительность опыта. План проведения опыта обычно включает в себя два–три варианта питательных добавок и опыты с необработанными контрольными бутылками.

Период проведения опыта должен быть достаточно продолжительным для того, чтобы водоросли уверенно пошли в рост, например, шесть суток. Воду в инкубаторе перемешивают стеклянными палочками два раза в сутки. Определения концентраций питательных веществ выполняют в самом начале периода роста, а также через три и шесть дней после начала опыта. Необходимо определить содержание хлорофилла «а», а также различные формы основных питательных веществ (азот и фосфор). Из инкубатора отбирают и консервируют / фиксируют пробы фитопланктона, которые анализируют методом Утермоля. Метод позволяет определить количественные (биомасса таксонов и общая биомасса фитопланктона) и качественные (взаимосвязи таксонов) изменения. Анализ фитопланктона рекомендуется проводить несколько раз в течение вегетативного периода для того, чтобы результаты отражали все особенности опыта (сравните с разделом 4.2.2).

Литература

- Nordforsk, 1973. Algal assays in water pollution research. Proceedings from a Nordic symposium, Oslo 25–26 October 1972. Publication 1973:2: 128.
- Pietiläinen, O.-P. and Niinioja, R. 2000. Nitrogen and phosphorous as algal growth limiting factors in a boreal lake. Verh. Internat. Verein. Limnol. 27: 2944–2947.
- Priha, M. and Langi, A. 2000. The impact of nutrient loading of pulp and paper mill effluents on eutrophication of receiving waters. In: Ruoppa, M. *et al.* 4th International conference on environmental impacts of the pulp and paper industry. The Finnish Environment 417: 165–171.

3.3

Определение биологически пригодного фосфора – тест с использованием водорослей

Петри Экхольм, Институт окружающей среды Финляндии (petri.ekholm@ymparisto.fi)

3.3.1

Общие сведения

Фосфор поступает в водоем из различных источников. Некоторая часть фосфора является биологически пригодной и потребляется различными водорослями и другими первичными продуцентами. В этом случае говорят, что фосфор имеет «эвтрофное влияние» на водоем. Указанная биологически пригодная часть изменяется в весьма широких пределах. Пригодность фосфора обычно определяется с помощью теста с использованием водорослей. Во время этого теста водоросли и исследуемая проба помещаются в одну суспензию (так называемый тест Бача).

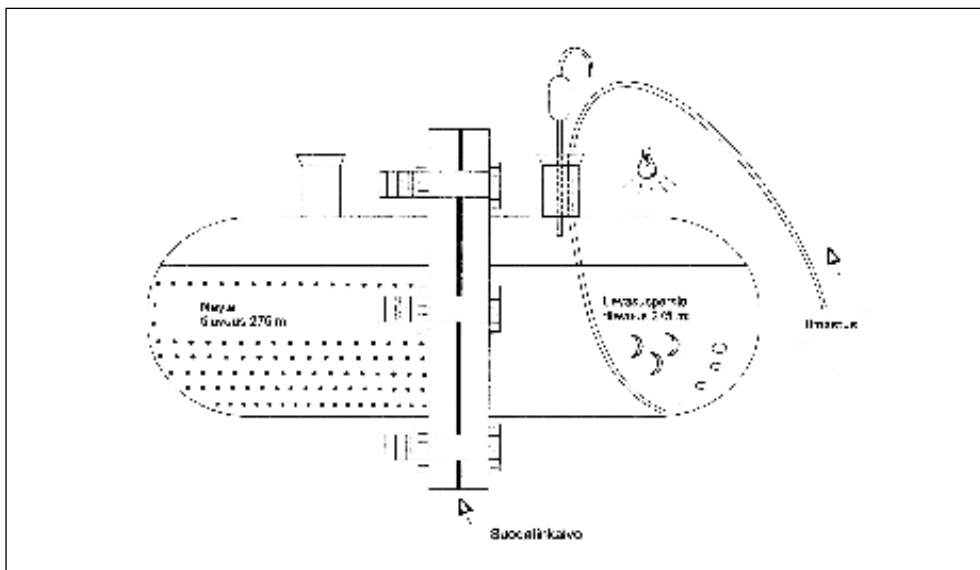


Рис 1. Двойной инкубатор для водорослей

Метод очень напоминает тест с использованием водорослей на токсичность, периодически его применяют и в Финляндии (Krogerus, Ekholm, 1998). Значительная часть тестов для определения биологически пригодной части фосфора является так называемыми «dual culture assays – тестами с двойной культурой», которые и описаны в этой главе.

Данный метод потребление фосфора водорослями определяет с помощью двойного инкубатора (рис. 1). С одной стороны инкубатора (отсек для пробы) располагается исследуемая проба, а с другой (отсек для водорослей) – суспензия водорослей с определенным дефицитом фосфора. Метод разработан в Соединенных Штатах Америки и переработан для условий Финляндии. Несмотря на то, что первоначально метод был создан для определения потребления связанного со взвешенным веществом фосфора, он подходит и для работы с растворенным в воде фосфором. С помощью этого метода было изучено потребление фосфора, поступающего в водоем со сбросами сточных вод сельскохозяйственных предприятий, жилищно-коммунального хозяйства, лесной и деревообрабатывающей промышленности. Были исследованы воздействия рассеянной нагрузки, а также и влияние сбросов сточных вод различных предприятий и рыбоводческих хозяйств.

3.3.2

Принцип теста

Растворенный фосфор из отсека для пробы переходит через фильтр в отсек, где помещены водоросли. Так как водоросли испытывают недостаток фосфора, то они начинают быстро потреблять его в процессе роста, возникает градиент концентрации фосфора. Условия теста с использованием водорослей являются практически оптимальными, но фосфор они получают

только из исследуемой пробы. Количество и скорость потребления фосфора водорослями оцениваются по изменениям концентрации фосфора в тестируемых водорослях в течение всего опыта. Кроме того, определяют изменения концентрации фосфора в пробе воды.

3.3.3

Оборудование для проведения теста

Инкубаторы для водорослей производит Labogexin Oy. Инкубатор объемом примерно 600 мл состоит из двух, противоположных друг другу частей, установленных на фланцевых соединениях (рис. 2). Между частями находится фильтр (фильтр из поликарбоната Nuclero-ge, размер ячейки 0,4 мкм, диаметр 90 мм). Во избежание протекания между фильтром и фланцем установлено тонкое силиконовое кольцо. Части соединяются фланцами из поликарбоната, укрепленными нейлоновыми винтами. Между фланцами и инкубатором находится толстое силиконовое кольцо. Оба отсека затыкаются резиновыми пробками. В пробке водорослевого отсека есть вентиляционная трубка и трубка для отвода воздуха. В вентиляционную трубку под давлением через стерильный фильтр и силиконовую трубку подается воздух. Весь используемый при изготовлении инкубатора силикон является нетоксичным.

3.3.4

Проведение теста

Водорослевую суспензию с дефицитом фосфора готовят на основе 5% -ного питательного раствора Z8 (Kotai, 1972), pH которого должен быть от 7 до 8. В питательном растворе фосфора содержится всего 20 мкг/л. Суспензия инкубируется в течение 9 суток при температуре $+20 \pm 1$ °C и освещенности в 4200 ± 200 lux (флуорисцентные лампы «холодного» цвета). Для инкубирования используются 5-литровые бутылки. Питательный раствор изготавливается так, как описано в стандарте SFS 5072. При приготовлении бесфосфорного или содержащего только 20 мкг /л питательного раствора нужное количество раствора K_2HPO_4 заменяется раствором KCl.

Если пробы воды не содержат избытка фосфора, их можно тестировать без обработки, однако образцы взвеси перед проведением теста необходимо смешать с бесфосфорным питательным раствором. Содержание фосфора в образце следовало бы довести до 250 мкг /л.

В начале теста водорослевую суспензию с дефицитом фосфора разбавляют в соотношении 1:1 с бесфосфорным питательным раствором. Таким образом, закрепляются условия ограниченного содержания фосфора. Полученную суспензию (275 мл) заливают в водорослевый отсек инкубатора, и, соответственно, в отсек пробы – 275 мл образца. Отсек пробы закрывают алюминиевой фольгой для предотвращения роста водорослей, которые могут содержаться в пробе. Инкубатор выдерживается на специальном вибростоле не менее двух недель при температуре $+20 \pm 1$ °C и освещении в 4200 ± 200 lux. Непосредственно перед началом теста определяется содержание фосфора и в водорослевой суспензии, и в пробе воды. В течение всего опыта водорослевую суспензию заменяют новой еженедельно, и в старой суспензии определяют содержание фосфора. Как минимум один раз в ходе эксперимента делается контрольный опыт, когда в половину пробы заливается не образец, а раствор ортофосфата. Содержание годного фосфора выявляется, если известно изначальное содержание фосфора в пробе и количество усвоенного водорослями фосфора.

Литература

- DePinto, J. V. 1982. An experimental apparatus for evaluating kinetics of available phosphorus release from aquatic particulates. *Water Res.* 16: 1065–1070.
- DePinto, J. V., Young, T. C. and Martin, S. C. 1981. Algal-available phosphorus in suspended sediments from lower Great Lakes tributaries. *J. Great Lakes Res.* 7: 311–325.
- Ekholm, P. 1994. Bioavailability of phosphorus in agriculturally loaded rivers in southern Finland. *Hydrobiologia* 287: 179–194.
- Ekholm, P. 1998. Algal-available phosphorus originating from agriculture and municipalities. *Monographs of the Boreal Environment Research* 11. 60 pp.
- Kotai, J. 1972. Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. NIVA publ., B-11/69.
- Krogerus, K. and Ekholm, P. 1998. Availability of soil phosphorus to the green alga *Selenastrum capricornutum*. In: Berthelin, J., Huang, P.-M., Bollag, J.-M. and Andreux, F. (eds.) *Effect of mineral-organic-microorganism interactions on soil and freshwater environments*, Plenum Publishing Corporation, New York.

3.4

Седиментация

Анна-Стийна Хейсканен, Институт окружающей среды Финляндии, Объединенный научный центр, Италия

3.4.1

Общие сведения

На открытых участках водоемов и в прибрежной зоне источников органического и неорганического вещества довольно много: водоросли, планктон продуцентного слоя, атмосферные осадки и сбросы на водосборе и на побережье. Кроме того, часть веществ донных отложений переходит обратно в толщу воды.

Свежее органическое вещество образует донные отложения, главным образом, в конце осеннего развития водорослей. Диатомовые быстро оседают на дно. Органическое вещество попадает в донные отложения. Скорость погружения синезеленых водорослей обычно незначительная. Оседающее органическое вещество является важным источником питательных веществ для зообентоса. Обильная седиментация органического вещества может вызвать нехватку кислорода на дне.

Измерение параметров вещества, выпадающего в осадок, относится к так называемым «продолжающимся методам исследования» (дословный перевод). Пробоотборник собирает оседающие взвешенные вещества в течение длительного периода времени, за который исследователи получают картину происходящих в воде изменений. Метод также эффективен при изучении баланса веществ в водоеме, а также и при изучении трансформации ядовитых и токсичных веществ. Оседающее вещество можно изучать в озерах, дельтах рек, морских заливах и в открытом море. Метод не подходит для использования в проточной воде, так как сильное течение влияет на точность результатов.

Метод

В соответствии с данной методикой используют ловушки донных отложений с одним, а лучше тремя цилиндрами. Соотношение высоты и диаметра цилиндра должно быть 5 к 10. Диаметр цилиндра должен быть не менее 45 мм. К ловушке-пробоотборнику прикрепляют стабилизатор, удерживающий всю конструкцию по течению. Оборудование укрепляют на дне с помощью якоря, а к верхней части пробоотборника крепится поплавков. На одном экспериментальном участке по возможности рекомендуется установить несколько ловушек на разной глубине. Заметим, что наклон или крен цилиндра будет влиять на его накопительную способность. Ловушки размещают ниже продуктивного слоя воды для того, чтобы предупредить возникновение и рост водорослей в цилиндрах. Месторасположение ловушки следует обозначить достаточно крупным бумом и, по возможности, светоотражателем и маячком.

Период накопления ловушки может изменяться от нескольких дней до нескольких недель в зависимости от расположения опытного / экспериментального участка и плана исследований. Если оседающее вещество будет находиться в цилиндре более двух дней, можно применить консервант. Выбор его зависит от определяемых в дальнейшем параметров. В качестве консерванта используют концентрированный формалин. Консервант добавляют в специальный отсек (диффузор), крепящийся к внешней части цилиндра. Цилиндр наполняют слабым раствором формалина, смешанного с отфильтрованной или искусственной морской водой (плотность должна быть выше, чем в воде исследуемого водоема).

Собранный материал выливается через кран в нижней части цилиндра или выбирается из цилиндра. В период весеннего цветения, по возможности, ловушки нужно освобождать еженедельно. Летом и осенью промежуток может быть и более продолжительным. В работе используют готовые цилиндры, а также автоматизированное оборудование, снабженное несколькими отсеками для сбора вещества. Поднимать и хранить цилиндры следует в вертикальном положении.

Если содержание частиц относительно всей пробы остается малым, пробу можно обработать, как обычную пробу воды. Пробу делят на части, предварительно тщательно перемешав. Части фильтруют и изучают под микроскопом. Если количество частиц является достаточным относительно всего объема пробы, воду, отстоявшуюся над осевшим веществом, можно удалить декантированием или с помощью сифона. Затем пробу концентрируют в центрифуге и в дальнейшем анализируют как пробы донных отложений. Пробы сушат в чашках Петри. Из одной пробы можно выделить органическое и неорганическое вещество. Способ хранения пробы зависит от последующего анализа.

Пробу анализируют, определяя следующие показатели:

- общее количество осевшего вещества (сухой вес);
- органические и неорганические частицы;
- углерод, питательные вещества, пигменты водорослей;
- фитопланктон и другие остатки планктона;

- тяжелые металлы;
- постоянные (труднорастворимые / долгоживущие) органические загрязнители (POPs);
- содержание хлорофилла «а» и других пигментов можно определить для получения дополнительных сведений о качестве воды.

3.4.3

Факторы, влияющие на результат

Расположение ловушек необходимо тщательно продумать, так как большая скорость течения, близость мелководных банок и прибрежной зоны вызывают образование ресуспензии, что приводит к переоценке первичной продукции. Программа анализов определяет выбор используемого консерванта проб.

Его использование может привести к тому, что на дне цилиндра будет мертвый фитопланктон и другие микроорганизмы. В связи с этим отстоявшийся материал необходимо проверить под микроскопом. Пробу пропускают через сито, затем фитопланктон отбирают под микроскопом. Образец процеживают еще раз через сетевое полотно с размером ячеек 200 μm . Однако при этом будет утрачена часть вещества донных отложений / осевших веществ. Консервирование приводит к погрешности, так как химический состав осадка изменяется. Если есть возможность часто опустошать ловушки (через 1–3 дня), то в применении консерванта нет необходимости. Перемещение осадочного материала в горизонтальном виде и «пятнистость» в его распределении также оказывают влияние на конечный результат.

3.4.4

Трактовка результатов

Измерения скорости процесса осадкообразования можно выполнять при оценке сезонной или годовой первичной продукции (другими словами, общей первичной продукции водорослей, на которую оказывают влияние внешние источники питательных веществ). Данные исследования являются важным элементом и при изучении баланса питательных веществ или во время изучения динамики питательных веществ в пелагической системе.

Метод дает стабильные результаты. Если измерения делаются вблизи береговой линии, на мелководье или в закрытых заливах, то ресуспензия оказывает значительное влияние на измерения вертикальных потоков. На открытых просторах водоемов это не является столь проблематичным. Если место крепления оборудования выбрано тщательно, то большая часть изменчивости при отборе проб вызвана скачками первичной продукции, а также особенностями циркуляции веществ и удерживающей способностью пелагической системы.

Литература

- Bloesch, J. 1994. A review of methods used to measure sediment resuspension. *Hydrobiologia* 284: 13–18.**
Bloesch, J. and Burns, N. M. 1981. A critical review of sedimentation trap technique. *Schweiz. Z. Hydrol.* 42: 15–55.

- Blomquist, S. and Håkanson, L. 1981. A review of sediment traps in aquatic environments. *Archiv fur Hydrobiologie* 91: 101–132.
- Blomqvist, S. and Larsson, U. 1994. Detrital bedrock elements as tracers of settling resuspended particulate matter in a coastal area of the Baltic Sea. *Limnol.Oceanogr.* 39: 880–896.
- Gardner, W. D. 1980. Field assesment of sediment traps. *J. mar. Res.* 38: 585–590.
- Floderus, S., Heiskanen, A.-S., Olesen, M. and Wassmann, P. (eds.) 1995. Seasonal dynamics of planktonic ecosystems and sedimentation in coastal Nordic waters. *Sediment trap studies in the Nordic Countries 3. Proceedings of a workshop held at the Helsingör Marine Biological Laboratory, Denmark, 21–26 January 1994.* Nurmi-Print, Nurmijärvi. 211 pp.
- Heiskanen, A.-S. 1995. Contamination of sediment trap fluxes by vertically migrating phototropic micro-organism in the coastal baltic Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 122: 45–58.
- Heiskanen, A.-S. 1998. Factors governing sedimentation and pelagic nutrient cycles in the northern Baltic Sea. *Monographs of the Boreal Environment Research* 8: 1–80.
- Solorzano, L. and Sharp, J. H. 1980. Determination of total dissolved phosphorus and particulate phosphorus in natural waters. *Limnol.Oceanogr.* 25: 754–758.
- Wassman, P. and Heiskanen, A.-S. (eds.) 1988. *Sediment trap studies in the Nordic countries 1. Proc. of workshop at the Tvärminne Zoological Station, Finland 24–28 February 1988.* Yliopistopaino, Helsinki. 207 pp.
- Wassmann, P., Heiskanen, A.-S. and Lindahl, O. (eds.) 1991. *Sediment trap studies in the Nordic countries 2. Proceedings of a workshop held at Kristineberg Marine Biological Station, Fiskebäckskil, Sweden, 21–25 November 1990.* Nurmi-Print, Nurmijärvi. 309 pp.

3.5

Метод исследования водного мха

Кари-Матти Вуори, Институт окружающей среды Финляндии
(kari-matti.vuori@ymparisto.fi)

3.5.1

Общие сведения

Водные мхи являются важными продуцентами первичной продукции, особенно в реках, где содержится много гумуса, быстрое течение и особенности освещенности ограничивают развитие других водных растений. По своей структуре, как и все мхи, они являются простейшими: у них нет опорных элементов и корней, и только корневые волоски удерживают растение на основании. Многие виды водных мхов образуются в местах с сильным течением и на неподвижных подводных поверхностях, например на камнях порогов. Некоторые виды распространились очень широко и приспособились к существованию в загрязненной воде. Растущие на дне в течение долгого времени мхи отражают характер нагрузок и экологическую обстановку в реке в целом. Водные мхи изучаются во многих речных водоемах Европы, особенно при мониторинге нагрузок и содержании металлов.

Пробы водных мхов можно брать с естественных поверхностей или ставить опыты с их пересадкой. Водные мхи незаменимы при исследованиях влияния металлов на водоем, а также при оценке и мониторинге загрязнения, вызванного органическими токсинами и радиоактивными веществами.

Новые побеги водных мхов быстро накапливают металлы в клетчатке и долго сохраняют их в повышенных концентрациях. Анализы свежих побегов позволяют изучать накопление металлов в короткие промежутки, а также устанавливать источники нагрузок, составлять карты нагрузок. Содержание металлов во всем растении отражает уровень загрязнения за более длительное время, а также тот уровень нагрузки, который могут переносить обитающие в водных мхах водные беспозвоночные и питающаяся ими рыба. Слой органического вещества на старых частях мхов, образующихся из микробов, простейших, грибов и водорослей, также хорошо впитывает металлы. В дополнение к сказанному отметим, что во мхах легко определить количество неорганических взвешенных веществ, исследовать осадкообразование и параметры нагрузок, связанных с поступлением взвешенных веществ. Метод изучения водных мхов получил признание в мониторинге качества и загрязнения воды в проточных водоемах.

3.5.2

Метод пересадки

Для метода пересадки обычно используют мхи семейства Fontinalis, которые легко собирать и пересаживать. Пучки водного мха пересаживают с незагрязненной территории на опытный участок. Предыстория пробы и изначальный состав должны быть хорошо известны. Мхи, снимаемые с поверхностей камней, должны быть собраны с одной и той же глубины, чуть выше среднего слоя воды (примерно половина глубины). Собранные руками мхи перевозятся на опытный участок в обработанных кислотой ведрах с крышками, сумках-холодильниках. В одном ведре помещается примерно три пучка мха. При подъеме мхов из воды следует соблюдать правила безопасности, и, работая на порожистых участках рек, исследователь может ограничиться тем, что каждая проба мха берется с участка, где он еще не перемещался. Водные мхи крепятся пластиковым хомутиком, используемым электриками для вязки пучков проводов, на поверхности и фиксируются с помощью якоря в русле реки – на опытном, исследуемом участке и в контрольной точке. Попутно отбирают сравнительные пробы, замораживаемые в лаборатории.

В план исследований по методу пересадки можно включить так называемый этап колонизации, во время которого перед тестированием придонные организмы образуют на мхах колонии. По окончании этапа колонизации пластины / поверхности со мхами и организмами перемещают непосредственно в объект исследований. При отборе проб пучки мхов отделяют от поверхностей субстрата в произвольном порядке. Затем их тщательно промывают в речной воде, избыток воды осторожно отжимают, образцы помещают в пакет для заморозки и закрывают. Пробы укладывают в сумку-холодильник и замораживают в лаборатории. Перед началом анализа их размораживают, и предназначенные для опыта части отрезают. Одна проба составляет 40–100 мг водного мха. Донные организмы, отбираемые вручную из мха, консервируются в 70%-ном этаноле для дальнейшего определения видового состава.

С помощью метода пересадки стремятся свести к минимуму различия между особями и видами. Он дает возможность выполнять контроль начала и продолжительности времени поступления загрязнений. Метод пересадки водных мхов применяется при определении качества воды, содержания металлов, хлорорганических соединений, а также при исследовании круговорота свинца в водоемах.

Метод исследования личинок ручейниц (водных бабочек)

Кари-Матти Вуори, Институт окружающей среды Финляндии
(kari-matti.vuori@ymparisto.fi)

Общие сведения

Изучение зообентоса является элементом многочисленных программ обязательного мониторинга водоемов (финансируются и выполняются предприятиями и консульт-фирмами), мониторинга состояния рек. Для бентоса выявлены определенные реакции на изменения в окружающей среде, которые проявляются в изменении мест обитания и изменениях численности видов. Специальные биотические индексы, связанные с бентосом, могут быть использованы в качестве ориентировочного показателя общего уровня изменений, происходящих в окружающей среде. Поскольку основное проявление нагрузок на окружающую среду связано с изменением числа особей и популяций живых организмов, то показатели смертности и размножения являются индикаторами роли загрязнения. Для зообентоса проточных водоемов разработаны индикаторы состояния здоровья, способные отразить вред от загрязнения конкретных водоемов и оценить границы допустимых концентраций загрязняющих веществ.

Наиболее эффективными индикаторами содержания токсичных веществ в водоеме являются личинки водных насекомых. Методики использования личинок ручейниц для определения нагрузок на окружающую среду разработаны в Центре окружающей среды Западной Финляндии.

В Финляндии встречается несколько видов семейства Hydropsychidae и Arctopsychidae. Они являются типичными представителями для разных типов проточных водоемов, их требования к условиям обитания относительно хорошо изучены. Благодаря быстрому обмену веществ водные насекомые хорошо подходят для исследований, при которых необходимо изучать особенности процесса накопления. Общее содержание металлов в личинках отражает металлы, накапливающиеся в тканях, во внутренностях и на оболочках личинок. Благодаря широкому распространению и обилию популяций, а также незначительным аккумулятивным различиям между видами, представители рода *Hydrop-syche* признаны хорошими индикаторами загрязнения водоемов металлами.

Структурные изменения паутин ручейниц также отражают изменения, произошедшие в состоянии природы. Личинки ручейницы-фильтровщицы плетут на камнях порогов шелковую паутину, структура которой в незагрязненных условиях является очень регулярной, правильной. В условиях, когда личинка вынуждена приспособливаться к условиям загрязненного водоема (например, при поступлении в водоем тяжелых металлов или органических соединений) в строении паутины отмечается явный сбой. Взаимосвязь между содержанием загрязнителей и сбоем в строении паутины доказана канадскими и шведскими учеными. Вероятнее всего, особенности поведенческих реакций проявляются именно при плетении паутины ручейницами. Нарушения или отклонения в узоре паутины можно считать первым сигналом избыточного содержания загрязняющих веществ проточных водоемов. Подобные нарушения были выявлены и в полевых исследованиях.

Индикаторами состояния здоровья отдельных особей и всей популяции можно считать также морфологические отклонения личинок. Изменения в анальных сосках и жабрах уже изучены довольно подробно. Морфологические изменения проявляются достаточно быстро (в течение нескольких дней). Они препятствуют нормальному развитию личинок. Поэтому изучение морфологических изменений идеально подходит и для проведения срочных тестов на токсичность, а также и в качестве индикаторов состояния здоровья природных популяций.

3.6.2

Методы

Лабораторные опыты

Для выяснения влияния загрязняющих веществ на экосистемы проточных водоемов были разработаны прикладные микрокосмосы, которые можно использовать для проведения тестов на токсичность с использованием бабочек-ручейниц. В них исследуется поведение, морфология и рост личинок. Микрокосмосы представляют собой 1-литровые круглые пластмассовые емкости, ко дну которых прочно закрепляется слой искусственной растительности (дерн). Движение воды в емкостях создается путем прокачки сжатого воздуха через шланг с отверстиями. Личинки плетут паутину между искусственными волокнами-травинками.

В статичных условиях в течение 72 часов личинки подвергаются воздействию химических соединений или сточных вод. По окончании опыта структурные изменения изучаются под микроскопом. Во время проведения опыта можно изучать изменения, происходящие в поведении личинок. В аналогичных микрокосмосах можно исследовать и постоянные воздействия, применяя постоянное течение (опыт в потоке) или метод *in situ*.

Полевые исследования

Методы пересадки организмов и проведение тест-опытов в полевых условиях в последнее время стали частью программ по изучению влияния факторов окружающей среды на беспозвоночных. С помощью пересадки можно исследовать реакцию в развитии отдельных особей или популяции ручейниц в природных условиях. При проведении данного метода используется канализационная (пластиковая) труба (длина 35 см, диаметр 10 см), с одной стороны которой плотно крепится мелкая сетка (размер ячеей 0,5 мм), а с другой – снимающаяся крышка, изготовленная с этой же сетки. В трубу помещаются съемные пластины из пористой резины, в которую вколоты булавки для насекомых, служащие опорой для прикрепления личинок и плетения паутины. Личинки из чистых водоемов помещаются в трубу и транспортируются на опытные участки исследуемых водоемов. Во время тест-опыта ведут наблюдения за смертностью, развитием, морфологическими изменениями, а также за процессом и результатом образования куколок.

Литература

Vuori, K.-M. 2002. *Hydropsychid (Diptera, Hydropsychidae) gill abnormalities as morphological biomarkers of stream pollution. Freshwater Biology 47: 1297–1306.*

4 Исследования токсичности — ЭКОТОКСИКОЛОГИЯ

4.1

Общие сведения

Экотоксикологические воздействия на окружающую среду можно изучать различными способами. Результаты воздействия и особенности влияния проявляются в функционировании и в структуре биологической среды. Неоценимым преимуществом биологических тестов является то, что они исследуют именно особенности и результаты указанных воздействий.

Из-за крайней сложности природных экосистем практически невозможно получить полную и подробную информацию обо всех причинно-следственных связях, поэтому механизмы влияния необходимо измерять по отдельным частям. Пожалуй, самой сложной задачей в экотоксикологии является прогнозирование последствий влияния изменений в окружающей среде при малых концентрациях (долетальные дозы) и определение механизмов длительного приспособления сообщества живых организмов. В целом, чем более ограниченная часть экосистемы изучается, тем более точных результатов удастся достичь. В то же время, значительно сложнее и с большей ошибкой составляются прогнозы развития ситуации в реальной среде. Соответственно, чем сложнее набор факторов, тем ближе результаты к естественным условиям, хотя с увеличением числа переменных контроль причинно-следственных связей становится слабее.

Целью проведения тестов на токсичность является определение соотношения, взаимосвязи между реакциями приспособления и масштабом воздействия. С помощью тестов исследуют важнейшие параметры живых организмов экосистемы: смертность, размножение, рост и т. д. Следует учесть, что если для изучения используется микроскопически малый водный организм, то количество получаемого им вещества или дозу вещества отмерить невозможно (так, например, как в тестах с млекопитающими). Исследование соотношения воздействия и особенностей приспособления обычно основано на сведениях о концентрациях веществ в водоеме, либо в растворе тест-опыта. Среди экотоксикологических тестов наиболее употребимыми являются тесты с использованием одного или нескольких видов, а в настоящее время еще и тесты с использованием клеток.

Токсикологические тесты основаны на использовании национальных – SFS (www.sfs.fi) и международных стандартов ISO (the International Standards Organisation – www.iso.net) и CEN (Comité Européen de Normalisation). При выполнении тестов химических соединений используют инструкции Организации по сотрудничеству и развитию в Европе (OECD's Guidelines for the Testing of Chemicals). С небольшими отклонениями аналогичные инструкции применяются

в США (Агентство по охране окружающей среды – EPA, ASTM) и в Канаде (Environment Canada). Документация содержит весьма подробные описания методик. Методы, применимые для морских акваторий, есть в документах ХЕЛКОМА и OSPARCOM.

Стандарты

ISO, the International Standards Organisation, www.iso.ch
CEN, Comité Européen de Normalisation, www.cenorm.be

4.2

Краткосрочные тесты одного вида

4.2.1

Общие сведения

Краткосрочные тесты с использованием одного вида или срочные тесты на токсичность относятся к самым простым экотоксикологическим методам. С их помощью можно протестировать большие объемы проб, их можно применять в мониторинге, а также с целью быстрого контроля. Преимуществами тестов является скорость, возможность создания и контроля условий проведения теста, надежная повторяемость и сопоставимость результатов. Тесты одного вида отражают потенциальную угрозу исследуемого вещества для окружающей среды и концентрации уровня / степени приспособления вида. На основании теста одного вида, все-таки нельзя спрогнозировать влияние загрязнения на другие организмы. Влияние определенного вещества можно оценить более достоверно, если один и тот же объект (водоем) будет протестирован несколькими видами, представляющими различные уровни трофности и/или механизмы влияния.

Чаще всего методы являются статичными, в том смысле, что водный раствор не меняется в ходе теста. Таким образом, предполагается, что исследуемое вещество останется неизменным в течение всего теста или что изменение концентрации точно известно. Испарение и распад загрязняющего вещества, а также и любые другие особенности, влияющие на его концентрацию, необходимо учитывать уже на этапе подготовки теста. Тесты одного вида возможно проводить и в полустатических условиях или с использованием проточной воды.

При подготовке и составлении плана теста необходимо познакомиться со свойствами вещества не только с точки зрения устойчивости или неустойчивости. Нужно обратить внимание на то, что тест выявляет токсичность пробы, а не физические изменения среды, вызванные проведением опыта (например, изменение рН, содержания кислорода, осмотические факторы, изменение содержания взвешенных веществ). С другой стороны, необходимо учитывать, что, например, изменение рН может существенно повлиять на свойства изучаемой пробы. Поэтому решение об управлении условиями проведения опыта принимается отдельно в каждом конкретном случае.

Сопоставляемость и повторяемость теста на токсичность основаны на определенной устойчивости или сопротивляемости подопытного организма к токсичным веществам в

стандартных условиях проведения теста. Уход и инкубирование подопытных организмов необходимо проводить в постоянных, стандартных условиях и, кроме того, при проведении опытов использовать организмы одного возраста и состояния. Проверку устойчивости организмов к воздействию токсичных веществ нужно проводить на знакомом по токсичности соединении, влияние концентраций которого изучено благодаря многочисленным опытам. Более точные сведения содержатся в стандартной методике EN ISO 5667-16:1999, Water quality / Качество воды. Sampling / Отбор проб – Part / Часть 16: Guidance on biotesting of samples / Инструкции по биотестированию проб.

Тесты подходят для определения токсичности проб природных вод, сточных вод, растворов химических соединений в воде, а также для работы с различными матрицами токсичных соединений в воде. Область применения тестов может быть следующей: контроль за сбросами (сточные воды, свалки и т. п.), определение эффективности очистки, токсичности химических соединений (их опасность для окружающей среды, оценка рисков, торговые знаки и метки продукции, связанные с охраной окружающей среды), изучение источников поступления токсичных веществ и т. д. Разработаны варианты теста с целью исследования загрязненных земель и донных отложений, а также веществ, не растворимых в воде.

Литература

- Tana, J. and Lehtinen, K. J. 1996. The aquatic environmental impact of pulping and bleaching operations – an overview. *The Finnish Environment no. 17. Finnish Environment Institute. 103 pp.*
- Ahtiainen, J., Nakari, T., Ruoppa, M., Verta, M. and Talka, E. 2000. Toxicity screening of novel pulp mill wastewaters in Finnish pulp mills. In: Persoone *et al.* (eds.) *New Microbiotests for Routien Toxicity Screening and Biomonitoring. Kluwer Academic/Plenum Publ., New York.*

4.2.2

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ

Маарит Приха, АО Ekolab Environmental Oy (maarit.priha(@)ekolab.com) и Юкка Ахтиайнен, Институт окружающей среды Финляндии (jukka.ahtiainen@ymparisto.fi)

4.2.2.1

Световой бактериологический тест

Принцип

Бактерия *Vibrio fischeri* является распространенной гетеротрофной, анаэробной, грам-негативной бактерией морской среды. В процессе нормального обмена веществ бактерия излучает свет в видимом диапазоне длин волн при дыхании в условиях аэробного метаболизма. Принцип данного теста основан на снижении светоизлучения бактерии в условиях ее адаптации к действию токсичного вещества. Уменьшение светоизлучения свидетельствует о нарушениях в обмене веществ бактерии.

Снижение светоизлучения *Vibrio fischeri*, выросшей в чистых условиях, определяется статическим тестом. Из исследуемой пробы готовят серию растворов нескольких концентраций.

Растворы смешивают с суспензией световой бактерии и измеряют его светоизлучение люминометром через 5, 15 и 30 мин. с момента контакта. Светоизлучение раствора сравнивают со светоизлучением первоначального образца. На основании соотношения концентрация / сопротивляемость можно вычислить степень ЕС50- (или ЕС20-), которая связана с концентрацией пробы и снижает светоизлучение на 50% (20%) по сравнению с контрольным образцом.

О применении метода

Бактерия, как было указано, обитает в море, поэтому концентрация солей в опыте должна быть на уровне морской воды. Наиболее комфортным для бактерии является диапазон pH 6–8,5. Если pH тестового раствора укладывается в указанный промежуток, то его не нужно изменять. В других случаях pH рекомендуется довести до 7. С точки зрения сопоставимости результатов, с учетом различных типов проб и целей теста считается целесообразным поддерживать pH на одном и том же уровне. Поскольку тест основывается на измерении люминесцентного света бактерий, то повышенные цветность или мутность пробы, абсорбируя свет, могут привести к неверному результату (в сторону положительных значений). Об этом и других источниках погрешности подробно рассказано в описании стандартной методики.

Результаты исследований токсичности химических соединений, полученные по световому тесту с использованием бактерий, были сопоставлены с результатами исследований по методам токсикологии с использованием рыб (*Pimephales promelas*). Было изучено влияние более 200 химических соединений. Результаты по токсичности коррелировали между собой достаточно хорошо ($r = 0,81$). Сравнения с другими тестами на токсичность были проведены на несколько меньшем материале, однако в случаях достаточной выборки корреляция чаще всего была позитивной.

Пробы донных отложений и почвы можно смешивать с водой и определять токсичность этих экстрактов так же, как и в пробах воды. Другие экстракты химических соединений можно исследовать также, особенно в пробах, содержащих органические токсины. Такими являются, к примеру, этанол и DMSO. В этом случае необходимо сначала определить токсичность химического соединения и его допустимое содержание в тесте (МАС – максимально допустимая концентрация).

Стандарты

EN ISO 11348-1:1999; Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test). Part 1. Method using freshly prepared bacteria. (ISO 11348-1: 1998)

EN ISO 11348-2: 1999; Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test). Part 2. Method using liquid-dried bacteria. (ISO 11348-2: 1998)

EN ISO 11348-3: 1999; Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test). Part 3. Method using freeze-dried bacteria. (ISO 11348-3:1998)

Бактериологический тест *Pseudomonas putida*

Принцип

Pseudomonas putida является обычной грамотрицательной, гетеротрофной бактерией как в водной, так и наземной среде. Ее реакция на токсичные соединения характеризует негативное влияние и на другие гетеротрофные бактерии, особенно на деление клеток.

Клетки бактерии (*Pseudomonas putida* MIGULA, DSM 50026) инкубируют на особом питательном субстрате в стандартных условиях (21 °C). Во время опыта несколько поколений бактерий инкубируют в условиях различных концентраций. Во время инкубирования содержащиеся в пробе токсины могут ингибировать, замедлять / подавлять деление клеток. Прекращение роста в опытном растворе в сравнении с нулевой пробой во время инкубирования в течение 16 часов считается интоксикацией. Для инкубирования можно использовать колбы Эрленмейера, которые помещают во встряхиватель. Из колб через одинаковый промежуток времени отбирают пробы для измерения мутности спектрофотометром или турбидометром. Разработана автоматическая методика проведения теста, например, с помощью прибора Bioscreen C (Labsystems), который сам регулирует разделение проб на порции, инкубирование, замеры мутности и сбор результатов.

Токсичность проб получают по графику связи «порция / реакция (концентрация пробы) / прекращение роста». Рост бактерий в контрольной пробе должен происходить по экспоненциальной кривой в течение всего теста, особенно если стоит задача оценки воздействия химического соединения. Токсичность проб сточных вод и химических соединений выражают, как правило, в виде концентраций EC50 или EC10, что указывает на замедление роста на 50% или 10% по сравнению с нулевой пробой. В качестве сравнительного химиката применяют 3,5-дихлорфенол.

О применении метода

Метод применим для определения уровня токсичности проб воды, проб сточных вод, растворимых в воде химикатов, а также донных отложений и растворов проб почв. Как и в других тестах на «рост», содержащиеся в пробе питательные вещества могут вызвать увеличение роста бактерии по сравнению с контрольным образцом. При проведении теста часто можно заметить как стимуляцию, так и ингибирование / подавление роста.

Реакция пробы с поверхностью субстрата, образование осадка, испарение или повышенная цветность являются источниками погрешности. Воздействие цветности можно снизить, подобрав длину волны во время измерений мутности на спектрометре. Мутность можно снизить, выполнив фильтрацию пробы или обработав ее на центрифуге. Если основным фактором токсичности является pH, то его можно довести до 7. Отметим, что любые манипуляции с пробами могут повлиять на изменение их токсичности и поэтому должны быть всегда указаны в отчетах.

Пробы почв и донных отложений можно смешивать с водой и определять токсичность этих смесей так же, как и в случае обычных проб воды. Кроме того, можно применять и другие химикаты для экстракции, особенно при анализе проб, содержащих органические загрязнители.

Таковыми являются, например, метанол и DMSO. В таких случаях сначала необходимо определить токсичность химиката и его допустимое содержание в тесте (МАС – максимально допустимая концентрация).

Standard

EN ISO 10712:1996; Water quality – Pseudomonas putida growth inhibition test (Pseudomonas cell multiplication inhibition test). (ISO 10712 :1995)

4.2.2.3

Снижение потребления кислорода в активном иле

Принцип

Ниже дано описание стандартного метода для оценки снижения потребления кислорода микробами в активном иле под влиянием тест-вещества. Ингибиционное воздействие может быть направлено на дыхание и на процесс нитрификации. Метод дает сведения об ингибирующем или стимулирующем влиянии за время краткого воздействия (до 180 мин.). Активный ил в соединении с подходящим, легкоразлагающимся субстратом быстро потребляет кислород. Скорость потребления зависит и от концентрации микробов. Если количество исследуемого опытного вещества достигает токсичного уровня, то потребление кислорода происходит медленнее. Замер концентрации кислорода выполняют кислородными электродами. Процесс уменьшения потребления кислорода оценивают, сравнивая результаты исследуемой пробы с результатами, полученными по контрольной пробе. Есть возможность и оценки абиотического расхода кислорода, вызванного физико-химическими факторами. Чувствительность активного ила к токсинам можно проверить с помощью определенного сравнительного вещества.

О применении метода

Данный метод подходит для тестирования растворимых в воде веществ. Он также применим для исследования сточных вод. Особое внимание необходимо уделять плохо растворимым в воде веществам, а также и к веществам, потребляющим кислород в процессе физико-химических реакций. В приложении к стандарту есть два прикладных примера. Метод «А» используется для исследований поверхностных вод, а метод «В» при оценке параметров работы биологических очистных сооружений сточных вод. Результаты нельзя напрямую применять для условий естественной среды.

Стандарты

EN ISO 8192:1995; Water quality – Test for the inhibition of oxygen consumption by activated sludge. (ISO 8192:1986)

Снижение скорости размножения микроорганизмов в активном иле

Принцип

Стандарт дает представление о методе, с помощью которого определяют потенциальную токсичность тест-вещества для роста аэробных бактерий, содержащихся в активном иле. Ингибирующее влияние ограничено только теми микроорганизмами, которые могут существовать в выбранной органической среде опыта. В тестируемый образец вводится посев микроорганизмов активного ила, бутылки с пробами инкубируются во встряхивателе. Общая продолжительность теста обычно составляет 6 часов, включая 4,5 часа, в течение которых происходит период приспособления. Биомассу пробы определяют любым подходящим способом. Рекомендуется замерять мутность спектрофотометром на длине волны 530 нм. По окончании инкубирования процент ингибирования / замедления роста высчитывается путем сравнения материала пробы и контрольной пробы. Чувствительность активного ила контролируется с помощью сравнительного вещества. При тестировании химических соединений рост в контрольной пробе должен происходить по экспоненциальной зависимости.

О применении метода

Метод подходит для тестирования природных, сточных вод и химических веществ, растворимых в воде в условиях теста. Полученная информация в результате помогает оценить влияние тестируемого вещества на деятельность аэробных бактерий биологических очистных сооружений сточных вод, а также правильно выбрать исходные концентрации для проведения тестов на разложение в аэробных условиях. Результаты теста, тем не менее, лишь дают примерные оценки, так как бактериальный состав активного раствора (из разных и даже из одного источника) и содержание в нем различных веществ может изменяться. Кроме того, лабораторные тесты никогда нельзя примерять напрямую к реальным природным условиям.

Стандарты

ISO 15522 : 1999; Water quality – Determination of the inhibitory effect of water constituents on the growth of activated sludge microorganisms.

EN-ISO 9509:1995; Water quality – Method for assessing the inhibition of nitrification of activated sludge micro-organisms by chemicals and waste waters.

ISO 13641-1:2003; Water quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria. Part 1:General test.

ISO 13641-2: 2003; Water quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria. Part 2: Test for low biomass concentrations.

ISO 18749:2004; Water quality – Adsorption of substances on activated sludge – Batch test using specific analytical methods

4.2.3

ТЕСТЫ НА БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

4.2.3.1

Тест на дафниях / ветвистоусых рачках

Маарит Приха, АО «Ekolab Environmental Oy» (maarit.priha(@)ekolab.com)

Принцип

Daphnia magna относится к очень распространенным ветвистоусым рачкам естественных водоемов. Тест основан на определении прямого, быстрого токсичного воздействия, эффект которого фиксируется, если исследуемый организм прекращает движение (на практике это чаще всего означает, что организм погибает).

Из исследуемой пробы готовят серию водных растворов, в которые помещают дафний в возрасте 24 часа. Количество организмов, прекративших движение, подсчитывают через 24 (48) часа с момента начала воздействия. На основании связи концентрации и реакции пробы можно вычислить значение EC50, соответствующее концентрации, при которой 50% подопытных организмов прекращает движение в течение 24 (48) часов. В зависимости от способа расчета концентрации EC50 прекращение движения можно фиксировать и во время периода привыкания.

О применении метода

В лабораторных условиях популяцию *Daphnia magna* поддерживают в достаточно большом количестве. Стандарты не дают однозначных указаний по содержанию популяции, требуя лишь того, чтобы за популяцией можно было наблюдать, и чтобы условия содержания были постоянными. Есть требование правильного учета и документации. *Daphnia* хорошо размножается при благоприятных условиях, образуя исключительно «женскую» популяцию, поэтому долгое время популяция остается генетически однородной. Популяцию *Daphnia* определенного типа можно приобрести из подходящей «коллекции». В лабораториях Финляндии часто используют популяции, изолированные от природных воздействий. При выборе способа инкубирования необходимо следить, чтобы условия роста (температура, освещение, pH воды, жесткость, содержание солей и т. п.) примерно соответствовали условиям проведения теста, чтобы адаптационный стресс не сильно влиял бы на результаты опыта.

Условия теста (температура, освещение, pH, жесткость, содержание солей, содержание кислорода и т. п.) оказывают влияние на сопротивляемость / устойчивость к интоксикации. Поэтому на условия теста необходимо обратить внимание, чтобы избежать неверных результатов и обеспечить повторяемость результатов опыта. Также и физические свойства пробы могут стать источником погрешности, если их не учитывать при проведении теста.

Стандарты

EN ISO 6341:1998; Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). Acute toxicity test.(ISO 6341:1996, korjattu 1998).

ISO 14669: 1999; Water quality – Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea).

ISO 16712:2005; Water quality – Determination of acute toxicity of marine sediment to amphipods.

ISO/CD 20665; Water quality – Determination of chronic toxicity to *Ceriodaphnia dubia*.

ISO/CD 20666; Water quality – Determination of chronic toxicity to *Brachionus calyciflorus*

OECD's Guidelines for the testing of chemicals 202 (1984) *Daphnia* sp. Acute immobilisation test and Reproduction test. Updated Guideline.

4.2.4

Тесты с использованием водорослей

Маарит Приха, АО «Ekolab Environmental Oy» (maarit.priha(@)ekolab.com)

4.2.4.1

Тесты с использованием водорослей в пресных водоемах

Принцип

Scenedesmus subspicatus и *Pseudokirchneriella subcapitata* являются планктонными одноклеточными зелеными водорослями пресных водоемов. Тест с их использованием основан на снижении роста водорослей под влиянием токсичного вещества. Из исследуемой пробы или образца готовят серию растворов различной концентрации с достаточным количеством питательных веществ. В растворы добавляют водоросли, находящиеся на экспоненциальной стадии роста. Попутно делают тест и со сравнительной пробой, в которой посев водоросли помещен только в питательный раствор. Тестируемые растворы инкубируются в постоянных условиях – при одинаковой температуре и освещении в течение 72 или 96 часов. Рост водорослей в растворах измеряется ежедневно. Снижение роста или снижение темпов роста водорослей фиксируется по результатам сравнительной пробы, помещенной в те же условия. На основании соотношения концентрация / реакция можно вычислить значение EC50, т. е. концентрацию, при которой рост водорослей снижается на 50% по сравнению с контрольной пробой в течение 72 или 96 часов. Отметим еще раз, что особенно при проведении теста на влияние химических соединений развитие водорослей в сравнительной пробе должно быть на стадии экспонентного роста.

О применении метода

Чистые популяции зеленой водоросли находятся во многих коллекциях. Популяцию можно поддерживать в течение долгого времени (месяцы) на питательном субстрате в холодильнике без подсадки молодых особей. Для проведения теста водоросль пересаживается в питательный раствор для инкубирования при стандартном освещении и температуре, где доводится до экспонентной стадии роста. В этом состоянии водоросль пригодна для проведения теста.

Изучая при помощи теста на водорослях токсичность, например, сточных вод, т. е. определяя влияние факторов, препятствующих росту водорослей, необходимо учитывать, что питательные

вещества, содержащиеся в пробе (или другие факторы, стимулирующие рост водоросли), оказывают влияние в противоположном направлении. Таким образом, результат теста является суммой двух противоположных процессов, поэтому часть возможного влияния токсичных веществ скрывается под влиянием питательных веществ исследуемой пробы.

Стандарты

EN ISO 8692: 2005; Water quality – Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae
EN ISO 10253: 1998; Water quality – Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornutum*. (ISO 10253: 1995)

ISO 14442:1999; Water quality – Guidance for algal growth inhibition test with poorly soluble organic solids, volatile compounds, heavy metals and waste water.

OECD Guidelines for the testing of chemicals, 201 (1989) Alga, Growth inhibition test. Updated Guideline.

4.2.5

Тесты на рыбах

Тарья Накари, Институт окружающей среды Финляндии (tarja.nakari@ymparisto.fi)

4.2.5.1

Тест на рыбе *Danio rerio*

Принцип

С помощью краткосрочных тестов на рыбах можно определить смертоносное воздействие вещества для определенного вида рыб. Тест позволяет изучить растворимые в воде химические соединения, а также сточные, поверхностные и подземные воды. Обычная продолжительность теста – 96 часов (48–96 часов).

Тесты на рыбе выполняются статичным или полустатичным методом. Используется и метод в проточной воде. В случае статичного метода изучаемый раствор не заменяется в течение всего опыта. С помощью статического метода определяется LC50 – летальная концентрация изучаемого раствора в течение 48 часов. В случае полустатичного метода часть раствора меняется ежедневно. Этот способ подходит для проб, концентрации которых можно поддерживать на требуемом уровне, при ежедневной замене раствора. В то же время ежедневная смена воды для рыб может оказаться большой нагрузкой. Чтобы этого избежать, следует использовать проточный метод, который и является в настоящее время наиболее распространенным при проведении краткосрочных тестов на рыбах. При проточном методе испытуемый раствор непрерывно заменяется. Метод подходит для анализа сточных вод и веществ всех типов, в том числе и таких, которые быстро изменяются в водном растворе. Концентрацию испытуемого водного раствора при проведении опыта следует постоянно контролировать для того, чтобы убедиться в ее неизменности. Продолжительность семистатичных и проточных тестов обычно составляет 96 часов.

О применении метода

Краткосрочные тесты на рыбах основаны на принципе «выбраковки» или «отсеивания». Их применяют, если стоит задача определения общего уровня токсичности пробы. Тесты выполняются в постоянных лабораторных условиях. В естественной среде токсичность чаще всего носит хронический характер, поэтому на основании результатов краткосрочных тестов определяют количество или дозу исследуемого вещества для дальнейших долгосрочных опытов или исследований.

Восприимчивость видов рыб к воздействию токсичных или вредных веществ может изменяться в зависимости от обмена веществ, возраста и размера особей, а также пола и зрелости. Из этого следует, что полученный результат нельзя переносить на другие виды рыб. С помощью теста получают первоначальные сведения о концентрации исследуемого вещества в условиях краткосрочного воздействия смертельно ядовитой для данного вида рыб.

Стандарты, как правило, рекомендуют, какой вид рыб можно использовать для проведения опыта. Важным условием выбора вида рыб является то, насколько легко его можно поймать в течение всего года и легко ли обеспечить проживание рыб в лабораторных условиях. Рыба должна быть здорова, без видимых отклонений в строении. Рекомендованные стандартами виды рыб могут быть заменены при соблюдении вышеуказанных критериев. Кроме того, условия проведения теста должны быть подходящими для выбранного вида рыб. В отчете необходимо указывать все отклонения от стандарта.

Стандарты

EN ISO 7346-1:1998; Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae). Part 1: Static method. (ISO 7346-1:1996).

EN ISO 7346-2 :1998; Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae). Part 2: Semi-static method. (ISO 7346-2:1996).

EN ISO7346-3: 1998; Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae). Part 3: Flow-through method. (ISO 7346-3:1996).

OECD's Guidelines for the testing of Chemicals. 203 Fish, Acute toxicity test 1992. Updated Guideline.

4.2.6

Тест Lemna

Эйя Шульц, Институт окружающей среды Финляндии (eija.schultz@ymparisto.fi)

Принцип

Ряска – это маленькие, плавающие отдельно друг от друга водоросли, встречающиеся в воде эвтрофированных водоемов и размножающиеся вегетативно. В качестве тестовой растительности в лабораторных условиях применяется маленькая ряска (*Lemna minor*) и куполообразная ряска (*Lemna gibba*). Оба вида существуют примерно в одинаковых условиях.

Для проведения опыта выбирают молодые, крепкие растения, выращиваемые в асептических условиях. До проведения теста растения выдерживают в условиях предстоящего опыта

не менее чем в течение недели. Из исследуемой пробы и питательного раствора готовится серия растворов различных концентраций. Перед началом опыта одинаковое количество растений помещается в отдельную емкость для инкубирования. Рост водорослей происходит в постоянных условиях.

Особенности воздействия определяют по изменению количества фронд по сравнению с контрольными растениями. Контрольные растения выращиваются только в питательном растворе, т. е. без добавок исследуемой пробы. По результатам вычисляется степень снижения роста EC50, вызванного тестируемым веществом. Количество фронд подсчитывается несколько раз в течение опыта. Все особенности условий опыта, изменения состояния и формы растений фиксируются в журнале. Помимо количества фронд, можно вычислить изменения сухого веса, количества хлорофилла и площади фронд.

О применении метода

Растущую в Финляндии ряску легко идентифицировать, однако конкретный вид следует определять аккуратно. Лабораторную популяцию *Lemna* можно вырастить самим или заказать аксеническую популяцию в каком-нибудь учреждении, работающем с этим видом. Инкубировать популяцию нужно при низкой температуре и в условиях незначительного освещения, тогда растения будут в хорошем состоянии при минимальном уходе.

Тест можно проводить статичным, полустатичным методами и в проточной воде. В случае исследований влияния легкоиспаряющихся веществ, необходимо убедиться в том, что содержание изучаемого вещества не слишком изменяется в течение опыта. Здесь уместно отметить, что и в других случаях следует убедиться в том, что концентрация исследуемых химических веществ и соединений в течение опыта не изменяется. Возможно, что для изучения плохо растворимых в воде веществ придется, например, воспользоваться каким-нибудь растворителем, тогда и в контрольных и сравнительных пробах содержание растворителя должно быть одинаковым.

Обычная продолжительность теста – 7 суток, но можно провести опыт и в течение 14 суток. Более продолжительный тест уже не обязательно будет отражать быстрое влияние. Пробы, содержащие много питательных веществ, могут ускорить рост и затруднить трактовку результатов.

Литература

- Bishop, W. E. and Perry, R. L. 1981. Development and evaluation of a flow-through growth inhibition test with duckweed (*Lemna minor*). In: Branson D. R. and Dickson K. L. (eds.) *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fourth Conference ASTM STP 737*.
- Davis, J. A. 1981. Comparison of static-replacement and flow-through bioassays using duckweed *Lemna gibba* G-3 US EPA 560/6-81-003, Washington DC.
- Wang, W. 1990. Literature review of higher plants toxicity testing. *Water, Air, and Soil Pollution* 59: 31–400.
- Wang, W. 1991. Higher Plants (Common duckweed, Lettuce and Rice) for Effluent Toxicity Assessment: Plants for Toxicity Assessment: Second Volume, ASTM STP 1115, Eds. JW Gorsuch, WR Lower and MA Lewis.

Стандарты

ISO 20079: 2005; Water quality – Determination of the toxic effect of water constituents and waste water to duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed growth inhibition test.

OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Lemna Growth Inhibition Test, Draft June 1998.

AFNOR XP T90-337: Détermination de l'inhibition de croissance de Lemna minor.

APHA – AWWA – WEF Duckweed (proposed) 8211, Standard Methods for Examination of Water and Wastewaters, 1995, American Public Health Association.

ASTM (1991) Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test with Lemna gibba. G3. American Society for Testing of Materials. E 1415-91.

US EPA (1995). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test using Lemna spp. "Public draft" EPA 712-C-05-156.

4.2.7

Тесты на генотоксичность и мутагенность

4.2.7.1

Тест Umu

Принцип

Тест основан на определении генной токсичности / генотоксичности пробы воды. Он отражает изменение и нарушение кода ДНК (система коррекции SOS), которые проявляются в гене *umuC* в сравнении с контрольным образцом. Под нарушением ДНК в этом методе подразумеваются такие изменения, которые не оказывают влияния на деление клеток. Если мутагенное влияние препятствует делению клеток, то его результат воздействия нельзя измерять с помощью данного теста.

В качестве тест-организма используют генетически модифицированную бактерию *Salmonella typhimurium* (популяция TA 1535/pSK1002). Популяция сальмонеллы была модифицирована путем введения дополнительной плазмиды (отрезок ДНК), которая содержит ген *umuC-lacZ*. Ген *umuC* отвечает и индуцирует исправление нарушений ДНК бактерий и *umuC*-оперон представляет собой группа последовательных генов, которая регулирует индуцирование гена *umuC*. В целом ген кодирует продукцию β -галактосидазии. *Umu*-оперон индуцирует нарушения ДНК, которые вызываются или являются последствием воздействия исследуемого вещества.

Поскольку *umuC*-оперон связан с геном *lacZ*, продукция β -галактосидазии также индуцируется и ее активность можно измерить. Активность в этой цепи напрямую связана с масштабом или числом нарушений в структуре ДНК. В пробах с различными концентрациями бактерии подвергаются воздействию в условиях, находящихся под контролем. Тест основан на способности генотоксичных веществ индуцировать *umuC*-оперон в популяции сальмонелл в противовес, т. е. как реакцию на нарушения ДНК. Благодаря способности оперона индуцироваться как следствие нарушений в структуре ДНК для проведения теста достаточно одной популяции *Salmonella*.

О применении метода

Метод может быть использован при оценке генотоксичности проб воды естественных водоемов и проб сточных вод. Он был разработан в Германии как тест, заменивший тест Ames. Опыт применения данного теста есть также в Швеции.

Standard

ISO 13829: 2000; Water quality Wa Determination of the genotoxicity of water and waste water using umu-test.

4.2.7.2

Тест Salmonella (Тест Ames)

Принцип

Данный стандарт описывает метод, определяющий генотоксичный потенциал проб воды водоемов и сточных вод. В тесте используют популяции *Salmonella typhimurium* TA 100 и TA98. Бактерии инкубируются в постоянных условиях в серии разбавленных проб в течение 48–72 часов при температуре 37 ± 1 °C. В ходе теста генотоксичные вещества, содержащиеся в воде водоема или в сточных водах, могут индуцировать мутации / изменения в одном или двух маркированных генах (*hisG46* в популяции бактерий TA 100 и *hisD3052* в популяции бактерий TA98) в зависимости от концентраций. В зависимости от дозировки индуцирование мутаций вызывает различные масштабы размножения колонии мутантов одной или обеих популяций в сравнении с контрольным образцом. Перед началом теста пробы воды и сточных вод фильтруют через стерильный фильтр, удаляющий твердые частички взвесей. Если генотоксичные вещества впитались в эти частички, то генотоксичность не наблюдается.

Стандарты

ISO 16240: 2005; Water quality – Determination of the genotoxicity of water and waste water using the Salmonella/microsome test (Ames test).

ISO 21427-1:2005; Water quality – Evaluation of the genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei - Part 1: Evaluation of genotoxicity using amphibian larvae.

ISO/FDIS 21427-2; Water quality – Evaluation of the genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei – Part 2: Mixed population method using the cell line V79.

4.2.8

Наборы для проведения биотестов

Аннели Йоутти, Институт окружающей среды Финляндии и Эйя Шульц, Институт окружающей среды Финляндии (anneli.joutti@ymparisto.fi)

Наряду с традиционными тестами на рыбах, растениях и беспозвоночных для проведения рутинных измерений были разработаны и краткосрочные биотесты или экспресс-тесты, выполняемые на микробах или связанные с биохимическими опытами исследования токсичности (микробиотесты). Микробиотесты основаны на использовании активности энзимов, биолюминесценции или на определении снижения темпов роста. По сравнению с

традиционными тестами микробиотесты являются простыми, быстрыми, дешевыми и, кроме того, их можно выполнять в небольших объемах (табл. 1).

В продаже есть около 20 готовых тестов (табл. 2). Большая их часть определяет токсичность в целом, но микробиотесты можно применять и для обнаружения определенных токсинов, таких как, например, бетагалакто시다зия-энзим бактерий, восприимчив к тяжелым металлам и невосприимчив к органическим соединениям. Тесты MetPLATE и MetPAD определяют только токсичность металлов.

Есть тесты и для определения наследственной токсичности (Mutatox, SOS-Chromotest), выполнение которых проще, чем в случае традиционного теста Амес (Ames).

Наборы для проведения тестов хороши для работы и в лаборатории, и в полевых условиях. Их можно использовать в лабораториях, где нет специального микробиологического / биологического оборудования или если нет возможности для инкубирования популяции организмов. Однако тесты нуждаются в помещении для инкубации, для выполнения некоторых из них необходим микроскоп, спектрофотометр, люминометр, прибор для подсчета ELISA и т. д.

В связи с тем, что наборы для тестов совсем недавно вошли в употребление, их пока мало применяют. Наиболее употребимым в международной практике тестом является биолюминесценция – Microtox, основанная на измерении продукции света. В Финляндии накоплен большой опыт по работе с тестами Toxi-Chromotest, MetPLATE и Mutatox. Эти наборы применялись в крупном проекте по тестированию отходов с целью использования

Таблица 1. Преимущества микробиотестов

Свойство	Особенности
Экономичность/эффективное использования денежных средств	Цена зависит от конкретного теста В противовес сложным тестам на рыбе
Легкость в исполнении	Особенно, если процесс автоматизирован
Обработка большого количества проб	Можно использовать популяцию, подверженную сухой заморозке 2 миллилитра вместо нескольких литров
Непродолжительный уход за популяциями во время инкубации	В противовес тестам на рыбах в аквариумах
Малый объем пробы	Одноразовое пластиковое оборудование Короткий цикл жизни микроорганизмов
Малые лабораторные емкости и емкости для инкубирования	Большое количество параллельных результатов
Нетрудоемкая обработка оборудования	
Быстрая реакция на действие токсина	Возможно проведение теста в полевых условиях
Точная / определенная и повторяющаяся реакция	
Необходимость в транспортировке	

Таблица 2. Примеры готовых микробиотестов

Тест	Принцип
Toxi-Chromotest	снижение биосинтеза энзима бактерии <i>E. coli</i> и β -галактосидации, измеряет острую токсичность, время действия < 24 часов
MetPLATE ja MetPAD	снижение активности энзима бактерии <i>E. coli</i> и β -галактосидации, измеряет токсичность, время действия 4–5 часов
Microtox Biotox	снижение светопродуктивности и биолюминесценции <i>Vibrio fischeri</i> , измеряет острую токсичность, время действия < 24 часов
Mutatox	увеличение светопродуктивности мутанта <i>Vibrio fischeri</i> , измеряет генотоксичность, время действия < 30 минут
SOS-Chromotest	измеряет генотоксичность
DaphtoxkitF	тест, основывающийся на смертности <i>Daphnia magna</i> или <i>pulex</i> , в течение 24–48 часов
Thamnotoxkit часов	тест основан на смертности <i>Thamnosiphon platyurus</i> , в течение 24 часов
Rotokit F	тест, основывающийся на смертности <i>Brachionus calyciflorus</i> , в течение 24 часов
Algaltokit f	тест, снижающий рост водоросли <i>Selenastrum capricornutum</i> , в течение 72 часов
IQ-testi	<i>Daphnia magna</i> , измерение флюоресценции, в течение 1 часа
FETAX	Frog embryo teratogenesis assay

свалок. Результаты биотестов (в том числе Toxi-Chromotest, MetPLATE, MetPAD) хорошо согласовывались с результатами химических анализов. На основе тестов можно было сделать предварительную оценку возможности размещения отходов на свалках.

Литература

- Bitton, G., Jung, K. and Koopman, B. 1994. Evaluation of a microplate assay specific for heavy metal toxicity. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 27: 25–28.
- Bitton, G., Koopman, B. and Agami, O. 1992. MetPAD: A bioassay for rapid assessment of heavy metal toxicity. *Water Environ Res.* 64: 834–836.
- Clément, B., Persoone, G., Colin, J. and Le Du-Delepierre, A. 1996. Estimation of the hazard of landfills through toxicity testing of leachates; Determination of leachate toxicity with a battery of acute tests. *Chemosphere* 33: 2303–2320.

- Debus, R. and Hund, K. 1997. Development of analytical methods for the assessment of ecotoxicological relevant soil contamination. Part B – Ecotoxicological analysis in soil and soil extracts. *Chemosphere* 35: 238–261.
- Dutka, B. J., McInnis, R., Jurkovic, A. and Liu, D. 1996. Water and sediment ecotoxicity studies in Temuco and Rapel River Basin, Chile. *Environ. Toxicol. Water. Qual.* 11: 237 DR 247.
- Jean, G. and Fruget, J. F. 1994. Comparison of ecotoxicological and physico-chemical data by use of multivariate analyses and graphical displays. *Chemosphere* 28: 2249–2267.
- Keddy, C. J., Greene, J. C. and Bonnell, M. A. 1995. Review of whole-organism bioassays: soil, freshwater sediment and freshwater assessment in Canada. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 30: 221–251.
- Lambolez, L., Vasseur, P., Ferard, J. F. and Gisbert, T. 1994. The environmental risks of industrial waste disposal: An experimental approach including acute and chronic studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 28: 317–328.
- Plotkin, S. and Ram, N. M. 1984. Multiple bioassays to assess the toxicity of a sanitary landfill leachate. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 13: 197–206.
- Schrab, G. E., Brown, K. W. and Donnelly, K. C. 1993. Acute and genetic toxicity of municipal landfill leachate. *Water, Air and Soil Pollution* 69: 99–112.

4.3

Долгосрочные тесты одного вида

4.3.1

Общие сведения

Концентрации химических веществ обычно быстро снижаются после попадания в водоем сбросов сточных вод и достигают уровня, перестающего быть смертоносным. В этих случаях результаты быстрых тестов не всегда отражают реальное влияние токсичных веществ, существующее в природе.

Долгосрочные тесты, напротив, дают результаты, близкие к реальности. С их помощью стремятся изучить воздействия, вызванные малыми концентрациями токсинов, а также и найти тот уровень концентраций, который является незначительным. Чтобы тест на токсичность был долгосрочным, он должен, в принципе, охватывать весь жизненный цикл исследуемого вида или, по крайней мере, его значительную часть. В отношении долгоживущих и созревающих организмов подобные тесты становятся трудновыполнимыми и отнимающими много времени. По этой причине ученые разработали менее продолжительные, а также и тесты, направленные на определенные, наиболее чувствительные этапы жизненного цикла. Таковыми являются, в частности, развитие половых клеток, размножение, состояние икры и мальков, особенности роста. Несмотря на относительно непродолжительное время тестирования, описанные в пункте 4.2 бактериологические и водорослевые тесты, а также тесты на ряске можно отнести к долгопериодным (хроническим) тестам одного вида.

4.3.2

Тест на размножение дафний

Принцип

Daphnia magna относится к рачкам эвтрофированных водоемов и является представителем первого уровня потребителей водной экосистемы. Тест оценивает негативное влияние на размножение и рост организма в результате долгосрочной или продолжительной интоксикации небольшими дозами загрязняющего вещества.

Область концентраций для проведения теста сначала определяется срочным тестом на токсичность. Исследуемое вещество разводят водой и готовят серию образцов, куда помещают дафний в возрасте не старше 24 часов. При проведении теста можно проследить смертность дафний и особенности ее размножения в течение 21 суток (примерно полтора поколения). При необходимости можно наблюдать за другими сублетальными реакциями (рост, период размножения, мальки-выкидыши). Реакция рассчитывается на основе количества выведенных в ходе опыта мальков на одну самку и, при необходимости – по скорости роста организмов, скорости роста популяции и нарушений в процессе размножения особей. Для статистических целей в обработке результатов используются различные методы анализа. Применяют и технику точечных оценок, опирающуюся на расчеты по модели «доза-реакция» образец – реакция; результаты выражаются в виде показателей NOEC, LOEC или IC50 и IC10.

О применении метода

Метод можно применять для тестирования воздействий растворимых в воде веществ, для исследования сточных вод и вод. Метод чувствителен к физико-химическому воздействию, вызывающему тестируемое вещество в инкубационной среде (O₂, pH, жесткость, осмотические условия, свет). При проведении опыта необходимо уделить самое пристальное внимание контролю токсичного влияния иных, помимо исследуемых, веществ.

Литература

- Nordberg-King, T. J. 1993. A linear interpolation method for sublethal toxicity: The inhibition Concentration (Icp) Approach. Version 2.0. National effluent assessment Centre Technical Report 03-93. Environmental Research Laboratory. Duluth, MN 55804.
- Stephan, C. 1986. LC50 Calculation Program. Version 2. U.S.EPA, Duluth, MN. Reviewed by R. Clements U.S. EPA and modified by M. Harrass.
- West In c. D. Gulley. 1994. Toxstat 3.4. West Ecosystems Technology Inc. Cheyenne, WY 82007.

Стандарты

- ISO 10706: 2000; Water quality – Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea).
- OECD's Guidelines for the Testing of Chemicals 202b (1984) *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test and Reproduction Test 211 (1998) *Daphnia magna* Reproduction Test. Report EPS 1/RM/21, Environment Canada, Environmental protection series, 1992. Biological test method: Test of reproduction and survival using the Cladoceran *Ceriodaphnia dubia*.

Тест с использованием икры и мальков рыб

Тарья Накари, Институт окружающей среды Финляндии (tarja.nakari@ymparisto.fi)

Определение уровня токсичности путем тестирования икры и мальков рыб

Принцип

Тест с использованием икры и мальков выполняется в постоянных условиях лаборатории. В Финляндии он чаще всего ставится на рыбе-зебре. Периоды развития рыбы-зебры легко наблюдать, так как ее икринки / яйца прозрачны, а икра доступна в течение всего года. Однако можно использовать и другие виды рыб, если условия проведения теста для них являются благоприятными. Важным критерием отбора является требование к тому, чтобы самку было легко содержать в лабораторных условиях, а оплодотворенная икра появлялась бы в течение всего года. Рыбы должны быть здоровыми, что требует специального заключения. Также желательно избегать излишнего внутреннего оплодотворения.

Оплодотворенную или неоплодотворенную икру подвергают воздействию исследуемого вещества в различных концентрациях, определяемых на основании срочного / быстрого теста. Икра подвергается воздействию так долго, пока все рыбы контрольной группы не начнут питаться самостоятельно. Чаще всего тест проводят в полустатических условиях, однако больше всего рекомендуется использовать метод в проточной воде. Последний подходит для всех типов веществ, в том числе нестойких в водном растворе. Проточный метод, кроме того, является более щадящим для икры и мальков.

Тест позволяет пронаблюдать смертность / гибель икры, ее развитие, выклевание мальков, их рост, развитие и смертность. Состояние икры и мальков необходимо проверять ежедневно, чтобы своевременно удалять умерших особей, быстро инфицирующийся остальной материал, что отражается на точности результатов.

Для того чтобы качество икры было удовлетворительным, самки должны быть здоровыми и в хорошем состоянии. Икру первого помета молодых самок не принято использовать для опытов. Рыба должна дважды отложить икру, прежде чем ее можно будет использовать в тесте. Рыба не должна давать потомство слишком часто, чтобы сохранить высокое качество икры. Приведенные в стандартах промежутки метания икры являются слишком короткими. Самки должны быть достаточно молоды. Стареющая рыба хуже откладывает икру, ее качество и смертность очень сильно изменяются. Кроме того, от состояния самки напрямую зависит смертность икры, которая в первые сутки должна быть предельно низкой. Смертность икры здоровых молодых рыб в первые сутки обычно не превышает 5%.

В тексте стандарта даются достаточно четкие указания по проведению теста, содержанию и обработке самок и мальков. Также существуют рекомендации по областям применения различных тестов.

О применении метода

В период размножения и на ранних стадиях развития рыбы становятся особенно восприимчивыми к воздействию различных химических соединений и ядовитых веществ. Принято считать, что только с помощью охватывающих весь жизненный цикл тестов можно получить достоверные сведения о токсичности того или иного вещества для рыб. Такие опыты выполняются в течение нескольких недель. Именно поэтому точность описанного выше метода с использованием икры и мальков ниже, чем тестов, изучающих весь цикл жизни или тестов, которые проводятся на ранней стадии развития организмов (early-life stage тесты). Различия в точности тестов на икре и мальках зависят от многочисленных факторов. Поэтому нельзя обобщать точность разных тестов на рыбах. Опыт исследований различных веществ, тем не менее, показал, что чувствительность и результаты тестов на икре и мальках хорошо коррелирует с тестами полного жизненного цикла. Еще раз отметим, что рекомендация по использованию рыбы-зебры не исключает возможности применения других видов рыб. В зависимости от вида рыбы условия проведения теста можно изменять, особенно в части температуры и количества рыб.

Для окончательных выводов о токсичности природных объектов нельзя использовать только результаты тестов на рыбах и мальках. Нет оснований и для обобщения результатов тестов на другие виды организмов.

Стандарты

ISO 12890: 1999; Water quality – Determination of toxicity to embryos and larvae of freshwater fish – Semi-static method.

ISO/DIS 15088; Water quality – Determination of the acute toxicity of waste water to fish eggs (Danio rerio).

4.3.3.2

Другие тесты

Для проверки токсичности химических соединений применяются следующие стандарты Организации по сотрудничеству и развитию в Европе – OECD:

- OECD's Guidelines for the testing of Chemicals – Инструкции для проверки химических соединений;
- OECD GL 204 Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-Day Study, 1984 Токсикологический тест на рыбах;
- OECD GL 210 Fish, Early-Life Stage Toxicity Test, 1992 Токсикологический тест на ранней стадии развития рыб;
- OECD GL 212 Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages, 1998 Токсикологический краткосрочный тест на рыбах на стадиях эмбриона и ранней стадии мальков;
- Report EPS 1/RM/22, Environment Canada, Environmental Protection Series 1992. Biological test method: Test of larval growth and survival using fathead minnows Методы биологического тестирования: тест на выживаемость и определение особенностей развития личинок гольяна толстолобика.

4.3.4

Методы, основанные на изучении физиологии рыб

Юкка Тана, АО «ÅF-CTS Oy» (jukka.tana(@)afconsult.com) и Марья Руоппа, Институт окружающей среды Финляндии (marja.ruoppa@ymparisto.fi)

4.3.4.1

Общие сведения

При изучении влияния химических веществ и сточных вод на окружающую среду можно использовать биохимические и физиологические методы исследования рыб. С их помощью выявляется вредное, отрицательное влияние уже на ранней стадии действия токсина, т. е. до того, прежде чем отравление проявится во внешних признаках рыб. Указанные методы дают представление о механизмах воздействия ядовитых соединений. Параметры тестов, используемых в физиологических исследованиях рыб, отражают важные области и разделы физиологии: гематология, обмен гидратов углерода, обмен посторонних веществ, осмотическое регулирование, изменение ионного состава, гормональная деятельность. Физиологические и биохимические параметры часто называют биомаркерами.

4.3.4.2

Методики исследований

Исследование физиологических особенностей рыб как метод определения воздействия сброса химических соединений и сточных вод на состояние водоемов можно разделить на три части:

- изучение влияния токсина в лабораторных условиях;
- опыты в садках;
- исследования рыб, выловленных в естественных водоемах.

4.3.4.3

Изучаемые параметры

Изучаемые параметры можно разделить следующим образом:

- анализы желчи, которые позволяют оценить реакцию организма рыб;
- морфометрические особенности, позволяющие оценить общее состояние и рост рыб;
- гематология, с помощью которой исследуют способность переноса кислорода кровью, а также и особенности иммунитета;
- обмен веществ в печени;
- параметры плазмы, с помощью которых исследуют нарушения тканей и особенности водного и ионного обмена;
- размножение, когда, например, наблюдают уровень гормонов в рыбах.

4.3.4.4

О применении методов

Методы, основанные на изучении физиологии рыб, успешно применяются для изучения влияния сброса сточных вод и последствий, вызванных привыканием к действию токсинов. Необходимо, однако, помнить, что выбор параметров для изучения воздействия сточных вод и для исследований водоемов, расположенных в зоне действия промышленных предприятий, не всегда будет одним и тем же. Эти параметры должны определяться всегда отдельно в каждом конкретном случае. В полевых условиях необходимо выбрать такие параметры, на которые метод ловли рыб, отбор проб и особенности воздействия токсина оказывали бы наименьшее влияние. В последние годы все большее внимание уделяется исследованию особенностей размножения и гормонального обмена рыб.

Литература

- Owens, J. W. 1991. The hazard assessment of pulp and paper effluents in the aquatic environment: A review. *Environ. Toxicol. Chem.* 10: 1522–1540.
- Soimasuo, M. 1997. The effects of pulp and paper mill effluents: A biomarker approach. *Biological research. Reports from the university of Jyväskylä no 60.*
- Tana, J. and Lehtinen, K-J. 1996. The aquatic environmental impact of pulping and bleaching operations – an overview. *The Finnish Environment no 17.*

Стандарты

- ISO/DIS 23893-1; Water quality – Biochemical and physiological measurements on fish – Part 1: Sampling of fish, handling and preservation of samples
- ISO/DIS 23893-2; Water quality – Biochemical and physiological measurements on fish – Part 2: Determination of EROD

4.4

Тесты с использованием нескольких биологических видов – модельные экосистемы

Юкка Тана, ÅF-CTS Oy (jukka.tana (@)afconsult.com)

4.4.1

Общие сведения

Модели экосистем можно назвать упрощенными копиями естественных экосистем.

Термин «модель экосистемы» (микрокосмос или мезокосмос) используется для обозначения проведения достаточно сложного эксперимента. С одной стороны, моделью экосистемы может быть и простая инкубация в стеклянных бутылках нескольких видов живых организмов. В другом случае модель экосистемы – эксперимент в большом резервуаре, или даже в озере. Пример модели – опыты в садках, выполняемые в естественных водоемах. Все опыты объединяет стремление исследовать самые сложные взаимодействия, процессы и их одновременное влияние на несколько видов организмов, характерных для различных трофических уровней водоема.

Опыты, поставленные на моделях экосистем, позволяют уточнить прогнозы изменений, вызванные сбросом химических соединений и сточных вод.

4.4.2

Лабораторные опыты или микрокосмосы

Микрокосмос – это лабораторная имитация части экосистемы. Его условия (освещение, влажность, поступление воздуха, температура при смешении и т. д.) должны быть таковыми, чтобы система могла существовать самостоятельно и повторять баланс соответствующей природной системы. Модели и размеры микрокосмосов могут существенно варьироваться. Маленькие, созданные для работы в лаборатории микрокосмосы играют важную роль в проведении экотоксикологических исследований. Они просты с экологической точки зрения, миниатюрны по физическим параметрам, но могут быть повторены, и их условия можно стандартизировать. Для них характерна простая конструкция, а также малое количество биотических и абиотических факторов. Они практически являются самостоятельными экосистемами, а не моделями природных экосистем. С их помощью можно изучать свойства некоторых химических соединений для оценки особенностей в реальной, естественной среде. Однако с их помощью нельзя прогнозировать развитие событий в более крупных экосистемах, таких как озера, реки и моря.

4.4.3

Крупные модели экосистем или мезокосмосы

Наряду с биотестами крупные экосистемы, точно воссоздающие природные условия, создают основу для изучения влияния сточных вод и химических соединений. Методы хорошо подходят для изучения химического влияния токсинов, влияющих на окружающую среду. Также можно исследовать изменения и миграцию / перемещение веществ, выделять ключевые моменты и слабые звенья в функционировании экосистемы. С помощью опытов на мезокосмосах можно анализировать изменения, происходящие на уровне популяций. Также можно проследить другие важные особенности и параметры, как, например, энергетические потоки и трансформации питательных веществ. Результаты исследований можно применять для уточнения прогнозов, сделанных на основании расчетов по другим моделям. Преимуществом максимально точно выстроенной модели экосистемы (мезокосмоса) является то, что она достоверно отражает все процессы в имитируемой им экосистеме.

В Финляндии модели экосистем применяются для изучения влияния химических соединений и сточных вод промышленных предприятий на состояние окружающей среды.

Литература

- Luotola, M. 1984. Behaviour and effects of some xenobiotics as studied in laboratory model ecosystems, Jyväskylä yliopiston biologian laitoksen tiedonantoja 37. 84 pp.**
- Landner, L., Blanck, H., Heyman, U., Lundgren, A., Notini, M., Rosemarin, A. and Sundelin, B. 1989. Community testing and mesocosm experiments: Ecotoxicological tools with high ecological realism. In: Landner, L. (ed.) Chemicals in the aquatic environment. Advanced hazard assessment. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hongkong. 216–254.**

- Lundgren, A. 1985. Model ecosystems as a tool in freshwater and marine research. Arch. Hydrobiol. Suppl. 70(2): 157–196.
- Notini, M., Nagel, B., Hagström, Å. and Grahn, O. 1977. An outdoor model simulating a Baltic Sea littoral ecosystem. Oikos 28: 2–9.

4.5

Измерение токсичности донных отложений

Юсси Кукконен, Университет Йоэнсуу (jussi.kukkonen (@)joensuu.fi)

4.5.1

Общие сведения

Донные отложения озер и рек могут содержать большое количество посторонних примесей, источниками которых являются выбросы и сбросы предприятий. Ниже приводятся некоторые методы тестирования уровня токсичности донных отложений.

Методы во многом основаны на выпущенных Американской ассоциацией по тестам и материалам ASTM (American Society for Testing and Materials -АСТМ 1997) и ранее опубликованных результатах исследований.

4.5.2

Отбор проб, хранение, описание и обработка

Отбор проб

Отбор проб, по возможности, следует проводить в аккумуляционной зоне донных отложений (углубления и т. п.), где скапливаются даже очень мелкие седименты. При отборе проб нужно учитывать расположение источников сброса сточных вод, течение, однородность в распределении донных отложений, а также необходимое количество повторных проб. Также нужно помнить, что донные отложения являются трехмерным пространственным объектом. Поэтому выделение загрязнителей или примесей также должно быть трехмерным. Например, самое высокое содержание токсинов может находиться на глубине нескольких десятков сантиметров. Если исследователь не располагает этими данными заранее, то имеет смысл выяснить эти обстоятельства до отбора проб.

Отбор проб и их транспортировка в лабораторию должны проводиться с максимальной осторожностью для того, чтобы не повредить структуру пробы. Отбор проб можно производить различными пробоотборниками, каждый из них обладает своими преимуществами и недостатками. Чаще всего используется пробоотборник типа «Каяк» или ковшеобразные пробоотборники Экмана. Преимуществом трубчатого пробоотборника является то, что с его помощью удастся поднять неповрежденную колонку донных отложений, которая дает возможность изучения распределения веществ по вертикали, позволяет исследовать взаимосвязи между донными отложениями и пористыми водами.

Недостатком считается получение слишком малого, недостаточного для проведения анализа на токсичность количества донного вещества, и то, что пробоотборник можно использовать в местах только с относительно мягким дном. Хорошей стороной ковшеобразного пробоотборника считается большое количество пробы и пригодность для использования на самых разных типах дна. Отрицательными моментами являются нарушение слоистости, стратификации донных отложений и потеря, как правило, самых мелких частиц. Также возможно смешение пористых вод (растворов) донных отложений с водой водоема. Чаще всего для проведения опытов на токсичность выполняют 3–5 отборов проб, поднятых с одного участка. Пробы объединяют в одну. Плюсом такого метода можно считать то, что получают достаточно большое количество веществ и соответственно более достоверную информацию об особенностях дна. В то же время часть информации об особенностях пространственного распределения внутри опытного участка утрачивается.

Для транспортировки пробы должны быть упакованы как можно быстрее. Выбор емкостей для перевозки и хранения определяется рядом факторов. Невозможно дать общей для всех случаев рекомендации. Если объектом исследования являются органические вещества донных отложений, то рекомендуется использовать емкости из темного боросиликатного стекла. Образцы, содержащие тяжелые металлы, можно упаковать в пластиковую тару. Рекомендуются полиэтиленовые или политетрафторэтиленовые бутылки, если нет уверенности о примерном составе пробы. Необходимо соблюдать особую осторожность во время подготовки и очистки емкостей и резервуаров для проб. Помещенные в холод (или лед) пробы доставляются в лабораторию в максимально сжатые сроки.

Хранение

Как правило, пробы хранятся в тех же емкостях, куда их поместили при отборе. Хранение образцов всегда изменяет их свойства. До проведения биологического тестирования пробы рекомендуется хранить в темном и холодном месте ($-2-4$ °C). Опыты следует выполнять как можно скорее после доставки образцов в лабораторию, самое позднее – через две недели. Для выполнения химического анализа пробу можно заморозить, хотя некоторые исследователи советуют хранить ее в холодной бескислородной среде. В любом случае к анализу следует приступать без промедления.

Характеристика

Необходимо выполнить анализ физико-химических свойств образца донных отложений, взятого для проведения теста на токсичность. Минимальный список параметров должен включать в себя – сухой вес, остаток после прокаливания, содержание органического углерода и размеры частиц/гранулометрическая кривая. Донные отложения – весьма неоднородное вещество (матрица), поэтому анализ следует выполнять токсикологическими тестами отдельно для каждой пробы, а также используя параллельные пробы. Смешивать пробы нельзя. Кроме того, в зависимости от целей исследований и для подтверждения качества результатов рекомендуется определять pH воды в поровых растворах, концентрации растворимого в воде органического вещества и содержание аммония.

Обработка

Для проведения лабораторных испытаний пробы донных отложений необходимо обработать, чтобы они были гомогенны. Следует, однако, помнить, что любая обработка может привести к изменению свойств донных отложений, нарушает баланс между веществами-загрязнителями, пористыми растворами и другими частицами. Нарушается и доступность (пригодность в процессе потребления) загрязнителей с биологической точки зрения. Поэтому обработка и подготовка проб должны быть минимальны, обоснованы с точки зрения последующего анализа и, кроме того, подробно описаны в отчете.

Обработка проб донных отложений может включать в себя следующие этапы:

- 1) перемешивание, 2) просеивание, 3) добавка известного вещества (шифровка), 4) разведение чистым седиментом для проверки связи «доза–реакция», 5) удаление пористых растворов, 6) элутриатическая подготовка.

В следующих изданиях серии АСТМ можно найти более подробные описания тестов на токсичность донных отложений:

- планирование опыта (АСТМ E1525);
- биоаккумуляция примесей малощетинковыми червями (АСТМ E1688);
- тест на токсичность донных отложений с использованием бентоса (АСТМ E1706).

4.5.3

Другие рекомендации по проведению тестов

ASTM 1997: Annual Book of ASTM Standards, Section 11: Water and Environmental Technology, vol 11.05: Biological Effects and Environmental Fate, Biotechnology, Pesticides / Биологические эффекты и состояние окружающей среды; Биотехнология, Пестициды.

Environment Canada, Environmental Protection Series, Report EPS 1/RM/29, 1994. Guidance document on collection and preparation of sediments for physicochemical characterization and biological testing/ Руководство по отбору проб и подготовки донных отложений для проведения физико-химических анализов и биологических тестов.

Environment Canada, Environmental Protection Series, Report EPS 1/RM/30, 1995. Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant / Руководство по выполнению тестов на токсичность донных отложений с использованием сравнительных образцов с шифрованными токсинами.

Environment Canada, Environmental protection series, EPS 1/RM/32, 1997. Biological test method: Test for survival and growth in sediment using the larvae of freshwater midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*) / Метод биологического теста: Тест для донных отложений с использованием параметров роста и выживания личинок комара (*Chironomus tentans* или *Chironomus riparius*).

Environment Canada, Environmental Protection Series, EPS 1/RM/33, 1997. Biological test method: Test for survival and growth in sediment using the freshwater amphipod *Hyaella azteca*.

Environment Canada, Environmental protection Series, EPS 1/RM/35, 1998. Biological test method: Reference method for determining acute lethality of sediment to marine or estuarine amphipods / Метод биологического теста: Сравнительный метод определения быстрой смертности амфипод в донных отложениях морей и эстуариев.

5 Биоаккумуляция

5.1

Общие сведения

Самые опасные токсины, обнаруживаемые в окружающей среде, являются очень стойкими соединениями. Они способны копиться в питательных цепочках. Восприимчивость / чувствительность к воздействию химических соединений можно оценить, выполняя анализы содержания накопившихся в водных организмах токсинов, либо в отобранных в природе пробах, либо выполняя специальные лабораторные исследования. Существуют методы оценок и на основе расчетов по моделям. Процесс накопления можно исследовать и опытным путем с помощью определенных тестов. Межвидовые различия и особенности накопления токсинов довольно значительные, что затрудняет получение достоверных выводов о возможном увеличении концентраций химических веществ и соединений в окружающей среде. Определение концентраций токсинов в тканях животных, находящихся на вершине цепочки питания, позволяет выявить наиболее опасные для окружающей среды соединения.

5.2

Тест на биоаккумуляцию

Тарья Накари, Институт окружающей среды Финляндии (tarja.nakari@ymparisto.fi)

Накопление, увеличение концентраций химических веществ в живых организмах играет важную роль в сложных процессах приспособления к токсину и воздействия токсина на организм. В результате накопления содержание ядовитых веществ в живых организмах постепенно растет, что приводит к хроническому или субхроническому влиянию. Принято считать, что сама по себе возможность хронического влияния / воздействия позволяет отнести накопление к негативному свойству исследуемого вещества, хотя нанесенный им вред никак не проявляется. Между накоплением веществ и токсичностью все-таки нет прямой связи.

Вещества могут накапливаться в организмах в силу своих физико-химических свойств и/или через цепочки питания. Склонные к аккумуляции вещества обычно медленно распадаются, растворяются в жирах и являются хорошо абсорбирующимися соединениями. В силу этих особенностей даже незначительные выбросы или сбросы отдельных веществ могут принести заметный ущерб в результате накопления веществ.

зависимости от физико-химических свойств вещества, особенно от его растворимости в жире и воде, говорят о его потенциале в процессе накопления, отражающем способность вещества накапливаться в организме, в определенных органах или в тканях.

Наиболее достоверным методом определения склонности к накоплению являются тесты на рыбах. С их помощью определяют фактор биологического увеличения концентрации вещества, перешедшего из воды в ткани рыб (BCF = bioconcentration factor), отражающий связь между концентрациями вещества в воде и в тканях рыб. OECD – Организация по сотрудничеству и развитию в Европе разработала рекомендации по проведению теста, который уже стал достаточно постоянным. Кроме того, тестом на увеличение концентраций можно считать и транслокационный тест EPA (Американское Агентство по охране окружающей среды), который позволяет определить, в какой части рыбы происходит накопление токсичного вещества. Это, как правило, жирные ткани рыб. Накопление токсинов можно измерить и на других водных организмах, из которых наиболее употребимыми являются двустворчатые моллюски.

Стандарты

OECD GL 305, 1996. Bioconcentration: Flow-trough Fish test.
EPA, Federal Environmental Agency, Draft, July, 1992, Bioaccumulation.

5.3

Коэффициент деления октанол / вода

Тарья Накари, Институт окружающей среды Финляндии (tarja.nakari@ymparisto.fi)

Аккумуляция неполярных химических соединений в организмах тем выше, чем лучше вещество растворяется в жирах и чем меньше его растворимость в воде. Поэтому и были разработаны модели и уравнения корреляции, позволяющие сделать хороший количественный анализ о предполагаемом потенциале накопления в рамках определенных условий и ограничений. Возможный потенциал накопления химического вещества можно вычислить с помощью коэффициента: n-октанол вещества / вода (K_{ow} , $\log K_{ow} = \log P_{ow}$) или через растворимость вещества в воде.

Дело в том, что вещество накапливается в организме в соответствии с его липофильными свойствами – чем больше $\log P_{ow}$ вещества, тем лучше оно накапливается / концентрируется. Такая однозначная оценка, тем не менее, характерна не для всех веществ. В общих чертах можно сказать, что у вещества, $\log P_{ow}$ которого меньше 2,7, нет потенциала (для) накопления. С другой стороны, вещество, $\log P_{ow}$ которого находится между 2,7 и 6,0, считается концентрируемым и оказывающим влияние на окружающую среду. Если $\log P_{ow}$ вещества больше 6,0, то корреляция между $\log P_{ow}$ вещества и накоплением уже не является линейной. Такое липофильное вещество накапливается меньше, чем можно было бы предположить.

Коэффициент «октанол/вода» значительно изменяется в зависимости от pH вещества. Диссоциация кислоты влияет на определение коэффициента, так что достоверность полученных результатов может ухудшаться. На практике следует относиться критически к вычисленному потенциалу накопления, так как он не всегда численно соответствует реальным условиям.

Поэтому до выполнения собственно опытов для изучения накопления вещества необходимо получить максимум предварительных материалов о его свойствах.

Стандарты

OECD GL 107, 1995. Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method.

5.4

Метод выращивания двустворчатых моллюсков в садках

Сирпа Херве, Центр окружающей среды Центральной Финляндии
(sirpa.herve@ymparisto.fi)

5.4.1

Общие сведения

Определение органических соединений, находящихся в воде в малых и быстроизменяющихся концентрациях, напрямую с помощью химических анализов воды практически невозможно. В лучшем случае достоверную картину можно получить лишь в сильно загрязненном водоеме, либо вблизи промышленных выбросов, и только после проведения большого количества параллельных опытов. Поэтому по экономическим причинам использование химических методов анализа просто невозможно.

Для определения хлорорганических соединений разработан специальный метод, основанный на биоаккумуляции – метод инкубирования двустворчатых моллюсков. Принцип следующий: моллюски из чистых водоемов инкубируются в изучаемом водоеме в специальных садках-корзинах в контролируемых условиях – в поверхностном слое воды, вне пределов влияния донных отложений для того, чтобы моллюски получали питательные вещества только из проточной воды.

Отметим, что моллюски оказались крайне выносливыми подопытными организмами. Даже в сильно загрязненных водоемах за четыре недели инкубирования обычно погибает всего несколько моллюсков.

5.4.2

Отбор моллюсков для опытов

Моллюски (*Anodonta piscinalis*) отбирают из чистых водоемов и доставляют в лабораторию в воде, отбираемой там же. Перед помещением в аквариум моллюски моются сначала в воде, в которой транспортировались, а потом – в дистиллированной и деионизированной воде (< 15 °C), пока с их поверхности не сойдет вся грязь или другие приставшие материалы. После этого моллюски переносятся в большие аквариумы с водой из поверхностного слоя чистого озера.

Очистка аквариума и уход за моллюсками в лаборатории

Для достижения моллюсками требуемой чистоты их содержат в течение 2–3 недель в аквариуме, в комнате с регулируемой температурой + 15 °С. В этот период можно удалить всех слабых моллюсков из числа тех, что будут использованы в период опыта.

Перед помещением моллюсков лабораторные аквариумы необходимо тщательно вымыть. Они опусташаются и моются сначала деионизированной водой губкой, использующейся только для этих целей. Затем аквариумы ополаскиваются несколько раз деионизированной водой, между ополаскиваниями насухо вытираются. И, наконец, аквариумы опрыскивают из бутылочки с этанолом, после чего им дают высохнуть.

Аквариумные фильтры разбираются, их части моют щеткой теплой водопроводной водой. Затем фильтр ополаскивают деионизированной водой и собирают. Стекла, закрывающие аквариум сверху, также моют щеткой и синтетическим средством для мытья в теплой водопроводной воде. Затем стекла ополаскивают деионизированной водой и оставляют для высыхания.

Аквариумный песок промывают небольшими порциями сначала теплой водопроводной водой, затем горячей водопроводной водой и, наконец, деионизированной водой не менее трех раз. Камни-аэраторы полощут сначала горячей водопроводной водой, затем этанолом и несколько раз – деионизированной водой. Затем аэраторы соединительными шлангами крепятся к компрессору. В чистые аквариумы засыпается вымытый песок и наливается деионизированная вода. Фильтры и вентиляторы монтируются в аквариуме и включаются. Аквариумы накрываются стеклом, включается освещение.

Измеряется общее содержание фосфора в аквариуме. Добавляется питательный раствор теста AGP так, чтобы общее содержание фосфора в воде было < 50 µg/L и содержание кислорода > 80%. После этого аквариумам дают отстояться в течение нескольких дней. Затем в аквариумах определяют pH, электропроводимость, содержание O₂, NH₄-N, общего фосфора, общего азота и хлорофилла «а». Если все показатели находятся на уровне обычного, чистого водоема, то аквариумы готовы к помещению моллюсков.

Моллюски инкубируются в аквариумах в соответствии с графиком каждого конкретного опыта. В аквариумной воде определяется pH, электропроводимость, содержание O₂, NH₄-N и общего фосфора. Во время инкубирования уровень pH воды не должен опускаться ниже 6,5, а содержание кислорода – ниже 80%. Если pH воды < 6,5, то часть аквариумной воды заменяется новой, деионизированной, а если содержание кислорода падает ниже 80% - усиливают аэрацию. Если содержание кислорода поднимется выше 100%, то вентиляцию отключают до тех пор, пока кислорода не станет меньше 100%.

Общее освещение в лаборатории и свет в аквариуме включают утром и выключают в конце рабочего дня. При необходимости в аквариуме можно установить таймер для регулирования освещения. Состояние моллюсков проверяется ежедневно по утрам. Умерших моллюсков убирают, а слабых – помещают в отдельный аквариум. Количество моллюсков регулярно фиксирует.

Полевой этап в разведении моллюсков

Моллюсков следует максимально быстро перевезти в исследуемый водоем (в течение суток). Для этого используют пластмассовые тазы с аквариумной водой, которые предварительно тщательно промывают азотной кислотой (10%) и ополаскивают деионизированной водой. Температуру воды во время транспортировки нужно поддерживать неизменной с помощью пакетов со льдом. Для предупреждения контаминации в пакетах для льда должна использоваться дистиллированная, деионизированная вода (водопроводную воду нельзя использовать ни в коем случае).

В водоеме моллюски инкубируются в пластмассовых корзинах ровно четыре недели. На одном месте инкубации моллюсков должно быть 16. Инкубирование проводится вне зоны влияния берега в продуктивном поверхностном слое на глубине 1 метр. Таким образом, получают достоверную картину о поступлении хлорорганических соединений за время инкубирования. Осевшие на дно загрязнители не влияют на результаты теста. Корзины необходимо прочно прикрепить так, чтобы ветер или возможное течение не сместили бы их во время инкубации.

Ровно через четыре недели корзины с моллюсками поднимают из воды. Образовавшийся на них налет осторожно смывается водой на месте инкубирования, моллюски здесь же заворачивают по одному в алюминиевую фольгу. Моллюски с одного места инкубирования упаковываются в один пластиковый пакет, внутрь которого вкладывается лист бумаги с указанием места инкубирования, даты начала и окончания теста, количества живых и погибших моллюсков после окончания опыта. Пустые раковины не упаковываются. Во избежание смешивания образцов на пакете также указываются сведения о месте наблюдения, времени инкубирования и числе моллюсков.

В охлажденных с помощью аккумуляторов холода сумках-холодильниках моллюсков как можно быстрее перевозят с опытного участка в лабораторию, где их замораживают ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Обработку и анализ проб необходимо выполнить не позднее 6 месяцев.

Анализ моллюсков

Замороженных моллюсков размораживают на промокательной бумаге. Измеряется длина каждой особи, возраст, общий вес ($m = m_1 + m_2$), вес раковины, свежий вес мягкой части (m_1), вес сухой мягкой части (m_3), рассчитывают процент сухого веса. Взвешивание проводят с точностью до 0,01 г. Длина раковины измеряется по крайним точкам, а возраст – по годовым кольцам на створках.

Мягкую часть моллюска помещают во взвешенную маркированную стеклянную колбу, взвешивают и вычисляют свежий вес мягкой части. Перед началом анализа образцы следует гомогенизировать. Больших моллюсков измельчают в мелкую муку. Мелкие экземпляры измельчать не нужно, особенно если они целиком помещаются в экстракционную гильзу. В гильзу помещают примерно 10 граммов образца и взвешивают с точностью до 0,01 г.

Для определения процента жиров пробу экстрагируют в растворителе. Выпаренный в небольшой объем экстрагирующий раствор помещают во взвешенную трубку типа «Kimax» (с точностью до 0,1 грамма). Растворитель выпаривается струей азота до тех пор, пока вес не

перестанет изменяться. Процент содержания жира в пробе определяется в отношении к сухой пробе. В пробах жиров определяют некоторые органические соединения.

Полученный из экстракта жир растворяют в гексане, анализ продолжают с использованием газовой хроматографии (ГХ) в соответствии с тем, какие соединения необходимо определить. Результаты могут быть выражены в соотношении к сырому весу (fw, fresh weight или ww, wet weight), сухому весу (dw, dry weight) или к весу жиров (lw).

Литература

- Heinonen, P., Paasivirta, J. and Herve, S. 1986. Periphyton and mussels in monitoring chlorohydrocarbons and chlorophenols in watercourses. *Toxicological and Environmental Chemistry* 11: 191–201.
- Herve, S. 1991. Mussel incubation method for monitoring organochlorine compounds in freshwater recipients of pulp and paper industry. Department of Chemistry, University of Jyväskylä, Research Report No. 36: 1–145.
- Herve, S., Heinonen, P., Paukku, R., Knuutila, M., Koistinen, J. and Paasivirta, J. 1988a. Mussel incubation method for monitoring organochlorine pollutants in watercourses. Four-year application in Finland. *Chemosphere*, Vol. 17, No. 10: 1945–1961.
- Herve, S., Paasivirta, J. and Heinonen, P. 2000. Orgaanisten klooriyhdisteiden trendit 1984–1998 Suomen sisävesissä: Simpukkaseurannan tulokset. Trends of the Organic Chlorocompounds 1984–1998 in the Inland Waters of Finland: Results of the Mussel Monitoring (English Summary). *Keski-Suomen ympäristökeskuksen monistesarja* 38. 140 pp.
- Herve, S., Paasivirta, J. and Heinonen, P. 2001. Trends of organochlorine compounds in Finnish inland waters, Results of mussel incubation monitoring 1984–1998. *Environmental Science and Pollution Research*, Vol 8, 1/2001: 19–26.
- Herve, S., Heinonen, P. and Paasivirta, J. 2002. Survey of organochlorines in Finnish watercourses by caged mussel method. *Resources, Conservation and Recycling*, Volume 35, 1-2: 105–115.
- Herve, S., Prest, H. F., Heinonen, P., Hyötyläinen, T., Koistinen, J. and Paasivirta, J. 1995. Lipid-filled Semipermeable Membrane Devices and Mussels as Samplers of Organochlorine Compounds in Lake Water. *ESPR-Environ. Sci. and Pollut. Re-s.* 2(1): 24–30.
- Källqvist, T. 1973. Algal assay procedure (bottle test) at the Norwegian Institute for Water Research. In: *Algal assays in water pollution research, Proceedings from a Nordic symposium Oslo, 25-26 October 1972*. Nordforsk, Secretariat of environmental sciences, Publication 1973:2: 5–17.
- Paasivirta, J and Paukku, R. 1989. Use of composited samples to optimize the monitoring of environmental toxins. *Chemosphere*, Vol. 19, Nos. 10/11: 1551–1562.
- Paasivirta, J., Rantalainen, A-L., Welling, L., Herve, S. and Heinonen P. 1992. Organochlorines as environmental tainting substances: taste panel study and chemical analyses of incubated mussels. *Wat. Sci. Tech.* Vol. 25, No. 2: 105–113.

6 Разложение / деструкция химических соединений в биологических процессах

Юкка Ахтиайнен, Институт окружающей среды Финляндии (jukka.ahainen@ymparisto.fi)

6.1

Общие сведения

В принципе, все органические вещества природного происхождения являются разлагаемыми. В результате эволюции появились микробы, способствующие или выполняющие процесс деструкции или разложения органических веществ (бактерии, грибы и простейшие организмы). В соединении с абиотическими факторами они способны выполнить переход органических веществ в минеральные, которые будут доступны для нового цикла. Антропогенные органические вещества могут быть инородными для микробов и поэтому биологически неразлагаемыми (или трудноразлагаемыми). Однако со временем микробы вырабатывают способность к разложению новых химических соединений.

Существующие тесты для определения степени деструкции / разлагаемости. Условия этих тестов зачастую являются компромиссом между моделью идеальной среды и современной ситуацией. Заметим, что есть мнение, в соответствии с которым тесты на биологическую деструкцию слишком далеки от реальных условий окружающей среды. Однако тесты позволяют выявить потенциал биоразложения химических соединений в благоприятных условиях среды. Задача теста – определение сравнительных характеристик деструкции различных химических соединений.

6.1.1

Биологическое разложение

На деструкцию / разложение веществ в биологических процессах в природе оказывают влияние несколько причин и факторов. Среди них следует указать: свойства химических соединений (полярность, гидрофобность и т. п.), наличие популяции микробов и иных живых организмов, участвующих в биологическом разложении, а также физические и химические условия, особенно взаимовлияние последних.

Если химическое соединение является очень сильным токсином, то его разложение невозможно или проходит очень медленно. Если вещество находится в малой концентрации или его количество непостоянно, например, в случае редких, единичных сбросов в реки или с очистных сооружений, то способность к разложению не сохраняется в «памяти» микробов.

Различные абсорбирующие свойства химических соединений влияют на биологическую доступность веществ и, следовательно, на их разлагаемость. В процессе очистки сточных вод биологическая доступность химических соединений регулируется биологическими факторами (активный ил), а в естественной среде, например в почве, физико-химическими факторами. Если какое-нибудь токсичное, но потенциально разлагаемое вещество проходит сквозь насыщенный микробами верхний слой почвы, его разложение в нижних слоях происходит затем очень медленно. С другой стороны, строение и характер почвы (например, глиняные минералы и содержание органического вещества) оказывают значительное влияние на биологическую доступность и разлагаемость веществ. Если какое-нибудь вещество попадает, к примеру, в глинистую почву, то его содержание в начале, в водной фазе земли является высоким, и оно разлагается в процессе жизнедеятельности микробов. Однако молекулы химических веществ довольно быстро диффундируют в микрочастицы глины, в часть которых микробы проникнуть не могут, и после этого разложения не происходит. Со временем под влиянием других процессов (стремление к соблюдению баланса) происходит обратная диффузия, например, с водной фазой. Таким образом, на основании результатов быстрой фазы начального разложения нельзя делать выводы об окончательном распаде химического соединения.

Как правило, процесс аэробного разложения с энергетической точки зрения является более быстрым и выгодным в сравнении с анаэробным, за исключением, может быть, некоторых веществ. Для этого необходимо определенное количество воды и питательных минеральных веществ. При очистке сточных вод и при компостировании для разложения создаются оптимальные условия, в то время как на свалках стремятся, наоборот, препятствовать получению кислорода, образованию влажных условий именно для снижения деятельности микробов и, следовательно, для уменьшения выделения токсичных газов и образования дренажных вод.

Из биологических факторов важным является и наличие других микробов, не принимающих участия в процессе разложения определенных химических соединений. Некоторые бактерии и грибы практикуют четкое «разделение труда» в этом сложном процессе. Простейшие и другие живые организмы могут выделять полезные секреты и таким образом поддерживать разложение. Биологические факторы образуют сложное и обширное взаимодействие. Однако в качестве общего вывода можно сказать определенно: нет микробов – нет разложения.

Перечисленные выше факторы оказывают влияние на биологическую деструкцию, как в естественной среде, так и на очистных сооружениях сточных вод и в установках-компостерах. В них созданы наиболее благоприятные условия для разложения. Например, на биологических очистных сооружениях с применением активного ила происходит обезвреживание многих токсичных соединений.

Условия северных широт оказывают в основном негативное влияние на разлагаемость химических соединений: низкий уровень pH и температура воды, недостаток питательных веществ в воде и почве, а также и состав микробов, приспособившийся к олиготрофным условиям. Поэтому довольно трудно составлять прогнозы поведения химических соединений в наших северных условиях только на основании тестов, доступных на сегодняшний день.

Принципы тестирования биологического разложения

Современные тесты на определение потенциальной биоразлагаемости представляют собой достаточно грубые классификационные тесты (разлагается / не разлагается). Они не способны спрогнозировать поведение химического соединения в естественных условиях. Они были разработаны для воссоздания определенной среды, чаще всего – процесса очистки сточных вод. В литературе есть и описания системы тестов для более сложных природных условий (водоем, донные отложения, почва). Оценить влияние того или иного вещества на окружающую среду можно, располагая теоретическими данными о химическом строении и активности веществ (миграция, биодоступность), их токсичности, определенной опытным путем биоразлагаемости, а также возможном влиянии вещества в концентрациях, встречающихся в окружающей среде.

Большая часть тестов оценивает разлагаемость веществ в виде водных растворов или суспензий. Концентрации изучаемых химических соединений являются достаточно высокими (10–400 мг углерода/л) по сравнению с концентрациями в чистых водоемах или в сточных водах (\square g/L). Если концентрация изучаемого вещества является высокой, т. е. на уровне современных тестов, то в ходе опыта количество микробов, разлагающих его и получающих из него питательные вещества, растет по экспоненте, соответственно и разложение идет с ускорением. В малых концентрациях химическое соединение не способно обеспечить питанием популяцию разрушающих его микробов, не в состоянии поддерживать их размножение. В этих случаях речь идет о линейном разложении, происходящем через кометаболические реакции.

Количество подсаженных микробов в тестах превышает их естественный уровень. Для того чтобы результаты тестов можно было использовать на практике, разработаны следующие термины: «легкоразлагаемое» (или непосредственно разлагаемое) (ready biodegradability) и «медленноразлагаемое» (inherent biodegradability). Последний термин связан, в большей степени, со свойствами вещества, обуславливающими медленный распад вещества в природе.

Легкоразлагаемое вещество – это такое соединение, которое быстро распадается в самых жестких условиях теста. Он основывается на способности внедренных микробов использовать тестируемое вещество в своей жизнедеятельности, разлагая его, минуя этап приспособления.

Медленноразлагаемое вещество – это такое соединение, которое разрушается микробами благодаря их определенному генетическому составу. Популяция микробов способна разлагать такое в результате собственных обменных процессов. В этом случае необходимо выждать, пока микробы приспособятся к тестируемому веществу и начнут работать их потенциальные энзимные механизмы.

В тестах с применением растворов изучаемое вещество является, как правило, единственным источником углерода, выход (уход) которого замеряется. Суммарными показателями минерализации являются выход растворенного органического углерода (DOC), продукция оксида углерода или расход кислорода. В данном случае исследователь не получает сведений о процессах разложения или продуктах обмена веществ, которые могут оказаться более токсичными, чем исходное вещество. Тест дает только процентное соотношение – сколько вещества распадается / пропадает по сравнению с теоретическими оценками (ThDOC, ThOD).

В традиционных методах определения деструкции поверхностно-активных веществ измеряется первичная деструкция / первичное разложение, т. е. уменьшение содержания исходного вещества. В этом случае не получают сведений ни о минерализации, ни о продуктах распада. Более специфические данные о том, что происходит в ходе опыта, получают с помощью химического анализа исследуемого вещества и определяя концентрации в процессе обмена веществ.

С помощью помеченных радиоактивных соединений можно более точно проследить процесс разложения. Если необходимо изучить разложение химических соединений на уровне концентраций, которые встречаются в окружающей среде или, например, при исследованиях почвенных экосистем, использование меченых соединений является единственной альтернативой.

Содержание питательных веществ в тест-растворе, содержание кислорода, pH и температура влияют на результаты теста. Содержание исследуемого химического соединения должно вызывать во время теста ингибирование / уменьшение активности внедренных микробов. Токсичность можно определить с помощью биотоксических тестов до начала теста на разлагаемость. Это позволит определить необходимую концентрацию вещества для теста. Для плохо растворимых и испаряемых химикатов существуют модифицированные тесты. В Организации по сотрудничеству и развитию в Европе (OECD) и в Международной Организации по стандартам (ISO) в настоящее время идет активная работа по разработке тестов.

Источник и количество микробов, их приспособляемость к химическим соединениям являются важнейшими факторами при проведении теста. Они могут быть получены из популяций, встречающихся в различных средах: в водоеме, почве или в донных отложениях. Часто применяется и активный ил очистных сооружений сточной воды. Используемая в тесте популяция микробов должна быть репрезентативной и жизнеспособной, при этом она может содержать минимальное количество растворенного органического углерода. В руководстве по проведению теста обычно указывается количество биомассы микробов (масса взвешенного вещества) и допустимое содержание органического вещества.

Продолжительность теста составляет, как правило, 28 суток. Но от предположения о том, является ли исследуемое вещество быстрорастворимым, зависит промежуток, составляющий 10 суток с момента начала теста. Быстрорастворимое вещество в соответствии со стандартами OECD должно разлагаться на 70% за 10 дней. Вещество считается медленно разлагающимся, если 70% от его количества распадается за 28 суток.

Микробы для теста на разлагаемость обычно берутся из активного ила, из очищенных сточных вод, поверхностных вод или из почвенного экстракта. Плотность состава микробов на

один тест определяется содержанием взвеси. Условия теста и активность микробов проверяются с использованием сравнительных химических соединений (например, бензонат, анилин, ацетат или этиленгликоль), которые должны разложиться во время теста не менее чем на 70%. Дисперсия результатов для параллельных проб не должна превышать 20%.

Поскольку условия проведения тестов, особенно содержание тест-вещества и количество внедряемых микробов значительно отличаются от имеющихся в естественной среде, при оценке токсичности химических соединений до сих пор используют константы разлагаемости, по которым результаты экстраполируют для разных сред. Для точных измерений биологической разлагаемости необходимо выработать новые стандартные тесты в условиях, соответствующих существующим, а также уточнить базу для трактовки результатов уже имеющихся тестов.

6.1.3

Наиболее распространенные тесты

На практике чаще всего используют следующие параметры: DOC – растворенный органический углерод, расход кислорода и продукция оксида углерода. Именно эти показатели считаются лучшими для исследования деструкции. В качестве тест-растворов применяются, за небольшими исключениями, растворы тестов, утвержденных Европейской организацией по сотрудничеству и развитию, Европейским Союзом и Международной организацией по стандартам.

6.1.3.1

Методы OECD – Организации по экономическому сотрудничеству и развитию в Европе (1995)

Быстрое (ready) разложение:

OECD GL 301A, Деструкция растворенного органического углерода;
OECD GI 301B, Изменения / эволюция CO₂ (модифицированный тест Sturm);
OECD GL 301C, Модифицированный тест MITI (I);
OECD GL 301D, Тест в закрытой бутылке;
OECD GL 301E, Модифицированный тест OECD Screening;
OECD GL 301F, Манометрический респираторный тест.

Медленное (inherent) разложение:

OECD GL 302A, Модифицированный квазипостоянный тест на активном иле (SCAS);
OECD GL 302B, Тест Zahn-Wellens;
OECD GL 303C, Модифицированный тест MITI (II).

Другие:

OECD GL 303A, Аэробная обработка сточных вод;
OECD GL 304A, Медленное биоразложение в почвах;
OECD GL 306A, Биоразложение в морской воде;
OECD 1993. Инструкции по тестированию химических соединений;
OECD 1995. Тест на биоразложение в деталях / OECD Series on the Test Quidelines Programme. Environment Monograph No 98;
SETAC 1997. Доклады конференции SETAC по кинетике биоразложения.

6.1.3.2

ISO- standards

- ISO/TR 15462: 1997; Water quality - Selection of tests for biodegradability.**
- EN ISO 7827: 1996; Evaluation of the "ultimate" aerobic biodegradability of organic compounds in an aqueous medium. Method by analysis of dissolved organic carbon (DOC). (ISO 7827: 1994)**
- EN ISO 9408:1999; Evaluation of the "ultimate" aerobic biodegradability of organic compounds in an aqueous medium. Method by determining the oxygen demand in a closed respirometer. (ISO 9408: 1999)**
- EN ISO 9439:2000; Evaluation of the "ultimate" aerobic biodegradability of organic compounds in an aqueous medium. Method by analysis of released carbon dioxide.2000. (ISO 9439 :1999)**
- EN ISO 9887: 1995; Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds in an aqueous medium. Semi Continuous Activated Sludge method (SCAS test). (ISO 9887:1992)**
- EN ISO 9888: 1999; Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds in an aqueous medium-static test (Zahn-Wellens test). (ISO 9888:1999)**
- EN ISO 10634: 1996; Guidance for the preparation and treatment of poorly water soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium. (ISO 10634: 1995)**
- EN ISO 10707:1998; Evaluation of the "ultimate" aerobic biodegradability of organic compounds in an aqueous medium. Method by analysis of biochemical oxygen demand (Closed bottle test). (ISO 10707: 1994)**
- ISO 10708: 1997. Evaluation of the "ultimate" aerobic biodegradability of organic compounds in an aqueous medium. Method by determining the biochemical oxygen demand in a two-phase closed bottle test.**
- EN ISO 11733; 1998; Evaluation of the elimination and the biodegradability of organic compounds in an aqueous medium - activated sludge simulation test. (ISO 11733:1995)**
- EN ISO 11734: 1998; Evaluation of the "ultimate" anaerobic biodegradability of organic compounds in digested sludge – Method by measurement of the biogas production. (ISO 11734: 1995)**
- ISO 14593 :1999; Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium – Method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels (CO₂ headspace test).**
- ISO 14592 : 2002; Part 1. Water quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations – Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.**
- ISO 14592 :2002; Part 2. Water quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations – Part 2: Continuous river model with attached biomass.**
- ISO 16221: 2001; Water quality – Guidance for determination of biodegradability in marine environment.**

7 Отбор проб

Этап отбора проб играет важную роль во всех биологических исследованиях. Он значительно влияет на результаты опытов и тестов и их дальнейшее использование. Разработка стандартов на биологические методы исследований в свое время была начата именно со стандартизации руководств по отбору проб. Международная организация по стандартам ISO разработала множество указаний по отбору проб. Более подробные указания можно найти в стандартах ISO и CEN по каждому конкретному методу.

Стандарты по отбору проб:

ISO 5667; Качество воды – Отбор проб

Часть 1: Инструкции по составлению программы отбора проб;

Часть 2: Инструкции по оборудованию для отбора проб;

Часть 3: Инструкции по консервации и обработке проб;

Часть 4: Инструкция по отбору проб из озер и водохранилищ;

Часть 5: Инструкции по отбору проб питьевой воды и использованию воды в производстве продуктов питания и напитков;

Часть 6: Инструкции по отбору проб из рек и проточных водоемов;

Часть 7: Инструкции по отбору проб воды и пара на тепловых станциях;

Часть 8: Инструкции по отбору проб атмосферных осадков;

Часть 9: Инструкции по отбору проб морских вод;

Часть 10: Инструкции по отбору проб сточных вод;

Часть 11: Инструкции по отбору проб подземных вод;

Часть 12: Инструкции по отбору проб донных отложений;

Часть 13: Инструкции по отбору проб воды, сточной воды и активного ила;

Часть 14: Инструкции по контролю качества работ, отбору и обработке проб природных вод;

Часть 15: Инструкции по обработке и консервации проб активного ила и донных отложений;

EN ISO 5667 – 16:1998; Часть 16: Инструкции по биотестированию проб.

На практике данный стандарт представляет собой общие инструкции и указания, связанные с отбором проб, их предварительной обработкой. Стандарт описывает порядок выполнения биотестов, а также дает указания, связанные с трактовкой результатов.

Описаны и пути решения проблем, возникающих во время проведения биотестов. Особое внимание уделяется отбору проб, предварительной обработке проб, подготовке проб для анализа. Стандарт описывает обработку проб во время теста, особенно в тех случаях, когда исследуют пробы воды и сточных вод, содержащих неустойчивые соединения. В стандартах описаны

важнейшие принципы контроля качества биотестов, порядок трактовки и сообщения результатов. Большое внимание уделяется экотоксикологическим тестам на основе использования одного биологического вида. Часть тестов связана с определением особенностей разложения веществ и их накоплением. В стандартах описана подготовка для тестирования труднорастворимых в воде веществ, а также соединений, находящихся на границе растворимости в воде.

EN ISO 28265: 1994; Качество воды – Оборудование для отбора количественных проб крупных беспозвоночных и организмов с каменных субстратов в мелких пресных водоемах (ISO 8265: 1988).

EN ISO 27828: 1994; Качество воды – Методы отбора биологических проб. Инструкции по отбору водных беспозвоночных (ISO 7828 : 1985).

EN ISO 9391: 1995; Качество воды – Отбор проб водных беспозвоночных из глубоких водоемов. Инструкции по использованию пробоотборников для качественных и количественных исследований. Использование колонизации (ISO 9391 : 1993).

EN 13946: 2003; Качество воды – Инструкции по технике отбора и обработке проб диатовых донных отложений из рек с целью оценки качества воды.

ISO 16665: 2005; Качество воды – Инструкции по отбору и обработке проб макро-фауны в условиях неплотных донных отложений морей.

EN 14011: 2003; Качество воды – Отбор проб рыб с использованием электролова.

EN 14757: 2005; Качество воды – Отбор проб рыб с использованием стандартной сети с крупной ячеей.

EN/prEN 14962; Качество воды – Инструкции по выбору методики отбора проб рыб (в стадии разработки).

ISO 19493; Качество воды – Инструкции по исследованию донных отложений литорали и сублиторали морей (в стадии разработки).

8 Контроль качества

Для принятия правильных решений специалисты официальных природоохранных организаций нуждаются в качественной и достоверной информации о состоянии окружающей среды и факторах, оказывающих на нее негативное воздействие. С точки зрения единообразия и для сравнения результатов исследований необходимо доказать, что полученные результаты характеризуют именно изменения в окружающей среде. Это предполагает проведение целесообразного выполнения работ и правильного ведения документации на всех этапах работы. Хорошо спланированная, действенная программа контроля качества является единственным средством для подтверждения правильности результатов, их сопоставимости и научной ценности. Уровень качества результатов можно повысить, предъявляя к исследованиям единые требования и инструкции.

Обычно под контролем качества понимают систему мероприятий, которые должны быть выполнены в лаборатории, однако в действительности контроль качества необходимо осуществлять на всех этапах исследований. Как правило, комплекс работ состоит из нескольких этапов: планирование программы исследований, отбор проб, другие полевые работы, консервирование и транспортировка проб, лабораторный анализ или проведение тестов, обработка результатов и составление отчета. Контроль качества должен быть на всех указанных этапах.

Аналитический контроль качества является краеугольным камнем в обеспечении достоверности и сопоставимости полученной информации. Межлабораторные проекты по интеркалибрации позволяют выявить ошибки в аналитике, позволяют повысить сравнимость результатов анализа. Это особенно важно, когда результаты получают и обрабатывают в разных организациях и разных странах. Методы и этапы работ должны быть описаны самым подробным образом. Эту деятельность должны выполнять компетентные специалисты. Таким образом, появится возможность сравнения полученной информации. Данные требования предъявляются и к лабораторным, и к полевым исследованиям.

В международных стандартах (в частности серия ISO 9000) используется термин «аналитический контроль качества», который полностью подходит и может быть использован в биологических исследованиях. Качество всей цепочки сбора информации должно контролироваться и фиксироваться. Контроль качества делится на четыре части: подготовительный этап, внутренний контроль качества, внешний аудит качества, а также оценка и ведение документации.

Индивидуальная сертификация специалистов, отбирающих пробы

С целью улучшения качества исследований и мониторинга за состоянием окружающей среды в Финляндии была разработана система индивидуальной сертификации всех специалистов, отбирающих пробы. Ее задача – объективно обоснованная оценка профессиональной компетентности специалистов, работающих в официальных природоохранных организациях. Система была разработана в Институте окружающей среды Финляндии в 1998 году. В соответствии со стандартом ISO/IEC 17024:2003 начата работа по получению необходимых сертификатов.

Система позволяет проверить и подтвердить профессиональную компетентность специалистов в сфере отбора проб, проведения измерений и мониторинга окружающей среды. Под компетентностью или квалификацией в данном случае следует понимать то, что специалист знаком со всеми общими требованиями к качеству выполнения работ в области экологии и владеет специальными знаниями и навыками, необходимыми для принятия решений и практической деятельности. Специалист имеет право подтвердить свою квалификацию в одной или нескольких специальных областях.

Специальными областями являются:

1. Пробы воды (включая отбор проб из естественных водоемов, систем водоснабжения и очистки сточных вод, проб атмосферных осадков и подземных вод).
2. Пробы почв и твердых отходов (отбор проб почв, отбор проб на свалках, отбор проб подземных вод).
3. Пробы воздуха и атмосферных осадков (отбор проб воздуха и дождевой воды на предмет растворенных или смешанных с водой газообразных соединений, частиц и иных загрязнителей, а также пробы любых других атмосферных осадков). Специальная квалификация не требуется для измерения выбросов с использованием приборов.
4. Пробы живых организмов (отбор проб в природных сферах – водоемы, леса, сельскохозяйственные угодья и т. д., пробы растительности и образцов фауны, а также их обработка в полевых условиях).
5. Измерения и наблюдения за состоянием окружающей среды (в частности, в связи с оценкой состояния лесов мониторинг состояния почв, измерения в программе гидрологического мониторинга).

More info: <http://www.ymparisto.fi/palvelut/sertififi/index.htm>

Литература

Quality assurance in environmental Monitoring. A Guidance document. TemaNord 1997: 591. Nordic Council of ministers. 86 pp.

Quality assurance of fieldwork. TemaNord 1997. 590. Nordic Council of Ministers. 42 pp.

HELCOM, Manual for Marine Monitoring in the COMBINE Programme of Helcom. 2001. Part B. General guidelines on quality assurance for monitoring in the Baltic Sea.

ISO 17025; General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.

ISO 9001: 2000; Quality Management Systems – Requirements.

EN 14996:2006; Water quality – Guidance on assuring the quality of biological and ecological assessments in the aquatic environment

ISO 20281; Water quality – Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data.

Список рекомендуемой литературы

1. Жадин В. И. Методика изучения донной фауны водоёмов и экологии донных беспозвоночных // Жизнь пресных вод СССР. М.-Л., 1956. Т.4. Ч.1. с. 279–382.
2. Китаев С. П. Экологические основы биопродуктивности озёр разных природных зон. М., 1984. 207 с.
3. Константинов А. С. Общая гидробиология. М., 1986. 472 с.
4. Методические рекомендации по сбору и обработке материалов при гидробиологических исследованиях на пресноводных водоёмах. Зообентос и его продукция. Л., 1984. 54 с.
5. Методические рекомендации по принципам организации системы наблюдений и контроля за качеством воды водоёмов и водотоков на сети Госкомгидромета в рамках ОГСНК. Л., 1984. 40 с.
6. Руководство по гидробиологическому мониторингу пресноводных экосистем (Под ред. В. А. Абакумова). СПб., 1992.
7. Яковлев В. А. Оценка качества поверхностных вод Кольского Севера по гидробиологическим показателям и данным биотестирования. Апатиты., 1988. 26 с.

ЛИСТ ОПИСАНИЯ ПУБЛИКАЦИИ

Издатель	Институт окружающей среды (SYKE)		Время публикации Ноябрь 2006	
Автор(ы)	Марья Руоппа / Marja Ruoppa и Пертти Хейнонен / Pertti Heinonen (ред.)			
Название публикации	Биологические методы исследования качества воды в Финляндии (Biological surveying methods for waters in Finland)			
Название и номер серии публикаций	Справочное издание по охране окружающей среды номер			
Тематика публикации				
Части публикации/ другие публикации, вышедшие в рамках этого же проекта	Адрес публикации в системе "Интернет": http://www.ymparisto.fi/syke/julkaisut			
Резюме	<p>Данная публикация представляет собой перевод на русский язык оригинального текста на финском языке: Suomessa käytetyt biologiset vesitutkimusmenetelmät (toim. Marja Ruoppa ja Pertti Heinonen) Suomen ympäristö nro 682; 2004. Биологические методы исследования качества воды в Финляндии (ред. Марья Руоппа и Пертти Хейнонен). Серия "Состояние окружающей среды в Финляндии", номер 682, 2004.</p> <p>Особенности водоохранных мероприятий на поверхностных водоёмах в Европе определены в многочисленных документах Европейского Союза. С точки зрения формирования и контроля качества воды важнейшим документом является Рамочная Директива ЕС по водной политике (2000/60/EY), которая вступила в силу в 2000 году. Директива содержит необходимую информацию для определения типов водоёмов, их классификации, а также и для выполнения мониторинга состояния водных объектов. Для определения экологического статуса водоёма разработан список водных гидробионтов (планктон, водные растения, бентос и рыбы). Реализация Директивы ЕС по водной политике предполагает использование международных стандартов ISO и CEN.</p> <p>Данная публикация содержит описания важнейших биологических методов исследований, которые традиционно используются в Финляндии при проведении мониторинга и при изучении экологического состояния водоёмов. Кроме того, в публикации приведены гидробиологические и экотоксикологические стандартные методики, которые используются в исследованиях.</p>			
Ключевые слова	Исследования состояния окружающей среды, состояние водоёмов, мониторинг, гидробиологические методы исследований, стандартные методы, экотоксикология			
Финансирующая организация/заказчик	Министерство окружающей среды Финляндии, Центр окружающей среды Северной Карелии			
	ISBN 952-11-2449-0 (сшитое)		ISBN 952-11-2450-4 (PDF)	
	ISSN 1238-8602 (печатанное)		ISSN 1796-167X (сетевое)	
	Количество страниц 111	Язык Русский	Конфиденциальность Для открытой печати	Цена (вкл. НДС 8 %) -
Продавец/ дистрибьютор публикации	Институт окружающей среды Финляндии Suomen ympäristökeskus (SYKE), почтовый адрес: PL 140, 00251 Helsinki Телефон + 358 (0)9 4030 0100, факс + 358 (0)9 4030 0191 email: neuvonta.syke@ymparisto.fi			
Финансирование публикации	Министерство окружающей среды Финляндии			
Место и год издания	EDITA - многопрофильная компания, Хельсинки 2006			

KUVAILELEHTI

<i>Julkaisija</i>	Suomen ympäristökeskus (SYKE)		<i>Julkaisu aika</i> Marraskuu 2006	
<i>Tekijä(t)</i>	Marja Ruoppa ja Pertti Heinonen (toim.)			
<i>Julkaisun nimi</i>	Suomessa käytetyt biologiset vesitutkimusmenetelmät (Biological surveying methods for waters in Finland)			
<i>Julkaisusarjan nimi ja numero</i>	Ympäristöopas			
<i>Julkaisun tema</i>				
<i>Julkaisun osat/ muut saman projektin tuottamat</i>	Julkaisu on saatavana myös internetistä: http://www.ymparisto.fi/syke/julkaisut			
<i>Tiivistelmä</i>	<p>Tämä venäjänkielinen julkaisu on lyhennetty versio suomenkielisestä alkuperäisjulkaisusta: Suomessa käytetyt biologiset vesitutkimusmenetelmät (toim. Marja Ruoppa ja Pertti Heinonen) Suomen ympäristö nro 682; 2004.</p> <p>Euroopan pintavesien suojelua ohjaavat nykyisin useat EU direktiivit, joista vesien laadun kannalta tärkein on vuonna 2000 voimaan tullut Vesipuitedirektiivi (2000/60/EY). Siinä on esitetty lähtökohdat vesien tyyppittelylle, luokittelulle ja seurannoille. Vesistöjen ekologisen luokittelun perustan muodostaa vesieliöstö (plankton, vesikasvit, pohjaeläimet ja kalat). Vesipuitedirektiivin toimeenpano edellyttää kansainvälisten ISO ja CEN standardien käyttöä.</p> <p>Tähän ohjeistoon on koottu keskeisimmät käytössä olevat ja käyttöön soveltuvat biologiset menetelmät, joilla Suomen vesistöjen ekologista tilaa on perinteisesti tutkittu ja seurantatietoa tuotettu. Siihen on koottu myös kansainvälisenä yhteistyönä laadittuja vesibiologiaan ja ekotoksikologiaan liittyviä menetelmästandardeja. Yhdenmukaisten menetelmien käyttö parantaa tutkimustulosten vertailtavuutta ja vesistöjen ekologisen tilan luokittelua Euroopassa. Ohjeiston tavoitteena on antaa kokonaiskuva menetelmistä sekä helpottaa niiden valintaa ja käyttöä.</p> <p>Julkaisu on laadittu SYKEssä toimivan Biologisten vesitutkimusmenetelmien standardisointityö-ryhmän aloitteesta. Käännöksen laadintaan ovat osallistuneet Pohjois-Karjalan ympäristökeskus, Kaakkois-Suomen ympäristökeskus sekä Karjalan tiedeokeskus (Petroskoi, Venäjä).</p>			
<i>Asiasanat</i>	Ympäristön tutkimus, vesien tila, seuranta, biologiset vesitutkimusmenetelmät, menetelmästandardit, ekotoksikologia			
<i>Rahoittaja/toimeksiantaja</i>	Ympäristöministeriö, Pohjois-Karjalan ympäristökeskus			
	ISBN 952-11-2449-0 (nid.)		ISBN 952-11-2450-4 (PDF)	
	ISSN 1238-8602 (pain.)		ISSN 1796-167X (verkkokj.)	
	<i>Sivuja</i> 111	<i>Kieli</i> Venäjä	<i>Luottamuksellisuus</i> Julkinen	<i>Hinta (sis.alv 8 %)</i> -
<i>Julkaisun myynti/ jakaja</i>	Suomen ympäristökeskus (SYKE), asiakaspalvelu, PL 140, 00251 Helsinki puh.(09) 4030 0100, faksi (09) 4030 0191, email: neuvonta.syke@ymparisto.fi			
<i>Julkaisun kustantaja</i>	Suomen ympäristökeskus SYKE			
<i>Painopaikka ja -aika</i>	Edita Prima Oy, Helsinki 2006			

PRESENTATIONSBLAD

<i>Utgivare</i>	Finlands miljöcentral (SYKE)		<i>Datum</i> November 2006	
<i>Författare</i>	Marja Ruoppa och Pertti Heinonen (red.)			
<i>Publikationens titel</i>	Biologiska vattenundersökningsmetoder i Finland (Biological surveying methods for waters in Finland)			
<i>Publikationsserie och nummer</i>	Ympäristöopas			
<i>Publikationens tema</i>				
<i>Publikationens delar/ andra publikationer</i>	Publikationen finns tillgänglig också på internet: www.ymparisto.fi/syke/julkaisut			
<i>Sammandrag</i>	<p>Publikationen är abbrevierad översättning till ryska av den originala finska publikationen: Biologiska vattenundersöknings metoder I Finland, Miljö i Finland nr. 682; 2004.</p> <p>Skydd av utvatten styrs av många EU direktiv, varav det viktigaste är Europeiska unionens vattenramdirektiv (2000/60/EY). Direktivet ger grunderna för typindelning, ekologisk klassificering samt övervakning för sjöar och floder. Vattendragens ekologiska klassificering bygger på biologiska element (plankton, vattenväxter, invertebrater och fisk). Än så länge har bara en liten del av biologiska undersökningar och monitoring i Europa utförts enligt harmoniserade metoder.</p> <p>Handboken omfattar väsentliga metoder som har varit i bruk och är användbara för vattenbiologiska undersökningar i Finland. Den innehåller också nationella och internationella metodstandarder för vattenbiologi och ekotoksikologi. Användning av harmoniserade metoder förbättrar jämförbarheten av resultat och vattendragens ekologiska klassificering i Europa.</p> <p>Målsättningen har varit att ge en helhetsbild av forsknings metoder samt att underlätta val och bryk av dem i framtiden.</p> <p>Publikationen har uppgjorts av arbetsgruppen, som i SYKE ansvarar för standardisering av biologiska vattenundersökningsmetoder.</p>			
<i>Nyckelord</i>	Miljöforskning, vattenundersökningar, biologiska metoder, metodstandard, vattenkvalitet, monitoring, ekotoksikologi			
<i>Finansier/ uppdragsgivare</i>	Miljöministeriet			
	ISBN 952-11-2449-0 (hft.)		ISBN 952-11-2450-4 (PDF)	
	ISSN 1238-8602 (print)		ISSN 1796-167X (online)	
	<i>Sidantal</i> 111	<i>Språk</i> Ryska	<i>Offentlighet</i> Offentlig	<i>Pris (inneh. moms 8 %)</i> -
<i>Beställningar/ distribution</i>	Finlands miljöcentral (SYKE), kundservice, PB 140. 00251 Helsingfors, Finland, tel. (09) 4030 0100, telefax (09) 4030 0190. e-mail: neuvonta.syke@ymparisto.fi			
<i>Förläggare</i>	Finlands miljöcentral (SYKE)			
<i>Tryckeri/tryckningsort</i>	Edita Prima Ab, Helsingfors 2006			

DOCUMENTATION PAGE

<i>Publisher</i>	Finnish Environment Institute		<i>Date</i> November 2006	
<i>Author(s)</i>	Marja Ruoppa and Pertti Heinonen (eds.)			
<i>Title of publication</i>	Biological surveying methods for waters in Finland			
<i>Publication series and number</i>	<i>Environmental Guidebook</i>			
<i>Theme of publication</i>				
<i>Parts of publication/ other project</i>	The publication is available also in the internet www.ymparisto.fi/syke/julkaisut			
<i>Abstract</i>	<p>This publication is an abbreviated Russian version of the original Finnish publication: Biological surveying methods for waters in Finland , The Finnish Environment 682;2004. The translation has been made by scientists in Karelian Academy of Science, North Karelian Environment Centre and South-East Environment Centre.</p> <p>The current protection of European surface waters is governed by many EU directives. The most important one is the Directive of the European Parliament and the Council establishing a framework for Community action in the field of water policy (WPD) (2000/60/EC). The WFD will establish a framework for the protection of inland surface, transitional and coastal waters in the EU area. The main aims are to prevent any further deterioration, to protect and enhance the status of aquatic eco-systems and to achieve good ecological and chemical status of waters. The classification of fresh waters will be based on four biological elements (plankton, aquatic macrophytes, macroinvertebrates and fish). In WFD, CEN and ISO standards use is specified for classification and monitoring of biological elements.</p> <p>This guideline is a summary of the biological and ecotoxicological methods used and available for water quality research and monitoring in Finland. It includes short descriptions of the methods and also national and international methodstandards for biological and ecotoxicological water quality research. The aim is to give guidance on how to choose and use the methods. The publication has been prepared in cooperation with the national standardisation working group for the biological water research methods.</p>			
<i>Keywords</i>	Environmental research, water quality, biological methods, standards, monitoring, ecotoxicology			
<i>Financier/ commissionere</i>	Ministry of the Environment, North Karelian Environment Centre			
	ISBN 952-11-2449-0 (pbk.)		ISBN 952-11-2450-4 (PDF)	
	ISSN 1238-8602 (print)		ISSN 1796-167X (online)	
	<i>No. of pages</i> 111	<i>Language</i> Russian	<i>Restrictions</i> For public use	<i>Price (incl. tax 8 %)</i> -
<i>For sale at/ distributor</i>	Finnish Environment Institute, Custom service, P.O. Box 140, 00251 Helsinki, Finland Tel. (09) 40300100 Fax (09) 40300190, e-mail: neuvonta.syke@ymparisto.fi			
<i>Financier of publication</i>	Finnish Environment Institute (SYKE)			
<i>Printing place and year</i>	Edita Prima Ltd. Helsinki 2006			

Данная публикация содержит общее описание основных гидробиологических методов и стандартных методик исследований водоёмов, которые применяются в исследованиях на международном уровне и в Финляндии.

В публикации приведено описание:

- Методов оценки качества воды и состояния водоёмов
- Биологических тестов
- Методов экотоксикологических исследований
- Методов исследований аккумуляции веществ в организмах
- Методов исследования биологической деструкции веществ
- Методов отбора проб
- Вопросов контроля качества

Цель публикации – общее описание методов исследований.

Приведённые сведения помогут исследователям сделать свой выбор гидробиологической методики или стандартного метода.



S Y K E

Myynti: Edita Publishing Oy
PL 800, 00043 EDITA
Asiakaspalvelu: puh. 020 450 05, faksi 020 450 2380
Edita-kirjakauppa Helsingissä:
Annankatu 44, puh. 020 450 2566

ISBN 952-11-2449-0 (nid.)

ISBN 952-11-240-4 (PDF)

ISSN 1238-8602 (pain.)

ISSN 1796-167X (verkkoj.)